

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 35/28	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/28		49/00	Z 4 B 0 6 5
49/00		A 6 1 P 43/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00			1 0 1 4 C 0 8 7
	1 0 1	C 1 2 N 15/00	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 57 頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2000-546784(P2000-546784)	(71)出願人	ザ ユニヴァーシティー オブ サウス フロリダ
(86) (22)出願日	平成11年 5 月 7 日 (1999. 5. 7)		アメリカ合衆国 フロリダ州 33620-
(85)翻訳文提出日	平成12年11月 6 日 (2000. 11. 6)		7900 タンパ エフエイオー126 イース
(86)国際出願番号	P C T / U S 9 9 / 1 0 0 1 2		ト ファウラー アヴェニュー 4202
(87)国際公開番号	W O 9 9 / 5 6 7 5 9	(72)発明者	サンチェス-ラモス フアン
(87)国際公開日	平成11年11月11日 (1999. 11. 11)		アメリカ合衆国 33647 フロリダ タン
(31)優先権主張番号	6 0 / 0 8 4 , 5 3 3		パ カナリー アイル ドライブ 10435
(32)優先日	平成10年 5 月 7 日 (1998. 5. 7)	(72)発明者	ソング シジー
(33)優先権主張国	米国 (U S)		アメリカ合衆国 33647 フロリダ タン
(31)優先権主張番号	6 0 / 1 1 2 , 9 7 9		パ スウィート ジャスミン ドライブ
(32)優先日	平成10年12月17日 (1998. 12. 17)		18125
(33)優先権主張国	米国 (U S)	(74)代理人	弁理士 三枝 英二 (外 8 名)
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 脳および脊髄修復のためのニューロン源としての骨髄細胞

(57)【要約】

骨髄ストロマ細胞(BMSC)は、インビトロおよびインビボでニューロン様表現型に分化し、脱神経化ラット線条に移植される。BMSCは、移植部位に局在化し続かなかったが、脳全体に移動し、特異的脳領域に様々な構築パターンで統合した。BMSCの最も秩序立った統合は、小脳プルキンエ細胞の層状分布であり、そこでは、BMSC由来細胞はプルキンエ表現型を採った。BMCSは、部位依存性分化を示し、ニューロン特異的核タンパク質、チロシンヒドロキシラーゼおよびカルビンジンを含む幾つかのニューロンマーカーを発現した。BMSCは、ニューロン修復および遺伝子治療の戦略において特異的脳核を標的化するのに使用され得る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の脳または脊髄への移植に好適な非胎児性で、非腫瘍原性の、骨髄由来ニューロン細胞。

【請求項2】 移動可能であることを更に包含する、請求項1に記載の細胞。

【請求項3】 骨髄からニューロンを得るための新規な方法であって、該方法は、

a)骨髄細胞を提供する工程；

b)骨髄ストロマ細胞を選択する工程；

c)ストロマ細胞を分化剤とともに、細胞表現型がニューロンに変化するのに十分な時間インキュベートする工程、

を包含する。

【請求項4】 工程bが、造血幹細胞を分離することを更に包含する、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 工程bが、骨髄細胞および好適な培養培地をプラスチック製の培養培地容器に入れること、骨髄ストロマ細胞をプラスチックに接着させること、および培地を交換することにより他の細胞を除去することを更に包含する、請求項3に記載の方法。

【請求項6】 分化剤がレチノイン酸、成長因子、胎児ニューロン細胞またはその組合せから選択される、請求項3に記載の方法。

【請求項7】 成長因子がBDNF、GDNFおよびNGFを含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 レチノイン酸が9-シスレチノイン酸、全トランスレチノイン酸またはその組合せである、請求項6に記載の方法。

【請求項9】 個体自身の骨髄から自己移植のためのニューロンを得る方法であって、該方法は、

a)骨髄を回収する工程；

b)骨髄ストロマ細胞を選択する工程；

c)移植のための十分な細胞になるまで、骨髄ストロマ細胞をマイトジェンを含む

培地中でインキュベートする工程；

d)工程c)のストロマ細胞を分化剤とともに、細胞表現型がニューロンおよび／またはグリアに変化するのに十分な時間インキュベートする工程、
を包含する。

【請求項10】 マイトジェンがEGF、PDGFまたはその組合せである、請求項10に記載の方法。

【請求項11】 工程bが造血幹細胞を分離することを更に包含する、請求項9に記載の方法。

【請求項12】 工程bが、骨髓細胞および好適な培養培地をプラスチック製の培養培地容器に入れること、骨髓ストロマ細胞をプラスチックに接着させること、および培地を交換することにより他の細胞を除去することを更に包含する、請求項9に記載の方法。

【請求項13】 分化剤がレチノイン酸、成長因子、胎児ニューロン細胞またはその組合せから選択される、請求項9に記載の方法。

【請求項14】 成長因子がBDNF、GDNFおよびNGF、またはその組合せを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 レチノイン酸が9-シスレチノイン酸、全トランスレチノイン酸またはその組合せである、請求項13に記載の方法。

【請求項16】 請求項3に記載の方法によって発生される骨髓ストロマ細胞の細胞系であって、該細胞は、特異的な神経解剖学的領域に移動し局在化する能力を有し、そこではそれらが領域に代表的なニューロンに分化し特徴的な構築パターンで統合するように見える、細胞系。

【請求項17】 ニューロン細胞自己移植のためのキットであって、
a)骨髓を得るのに好適なシリンジ、
b)脱水された培養培地を有するプラスチック製フラスコ；
c)骨髓幹細胞

を含む、キット。

【請求項18】 神経変性疾患を治療する方法であって、請求項3により産生された充分量の細胞を該神経変性疾患を有する個体に投与することを包含する

、方法。

【請求項19】 疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、虚血、脊髄損傷、運動失調、またはアルコール症である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 ヒトニューロン細胞に対する物質の効果をスクリーニングする方法であって、該方法は、

- a) 移植されたヒトニューロン細胞を有する哺乳動物を提供すること、該細胞は哺乳動物脳中の少なくとも1つの特異的位置に移動した；
- b) 哺乳動物に物質を投与すること；および
- c) 哺乳動物を物質の効果について観察すること、
を包含する。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(背景)

使用の分野

本出願は、骨髄細胞が移植で使用されるためのニューロン表現型を発現するように、それらを培養する方法に関する。

背景情報

神経生物学者は、長い間、成人脳中のニューロンは貴重な巢の卵、即ち、時間や病気と共に減少し再構築することが不可能でないとしても困難な遺産のようであると考えていた。。パーキンソン病およびアルツハイマー病は、ヒト成人脳中でニューロンを再構築する困難を科学者が克服する治療を待っている神経変性疾患の例である。パーキンソン病(PD)は、中年または晩年の疾患であり、非常に緩徐な進行と長引く経過を伴う。HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE, 第2巻, 第23版, Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, FauciおよびKasper編, McGraw-Hill Inc., ニューヨークシティ, 1994, pg.2275。最も通例に観察される変化は、脳幹(黒質、青斑)中のメラニン含有神経細胞の凝集物中にあり、そこでは、異なる好酸球細胞質内封入と共に、反応性グリオシス(黒質で最も顕著である)を伴う様々な程度の神経細胞損失がある。(同上、2276に)。

【0002】

その十分に進行した形態で、PDは、容易に認められる。かがんだ姿勢、動きの硬直および緩慢さ、顔面表情の固定、四肢のリズミカルな震せんは、能動的な動き又は完全な弛緩で静まるもので、全ての臨床医に公知である。一般に、十分に進行した疾患の他の特性に付随するものは、加速歩行であり、それにより、姿勢緊張の異常によって効果的な歩行を要求される適切な反射調節を行うことを妨げられた患者は、あたかも身体の重力中心に追いつくように加速したペースで迅速な引きずり歩きと共に進行する。(同上、2276に)。

【0003】

PDの最近の治療は、定位手術を含むレボドパの導入前に利用可能であったどれよりも成功するけれども、いまだに多くの問題がある(同上、2277に)。困難さの

多くの基礎をなすものは、疑いもなくこれらの治療的手段のいずれも、ニューロン変性からなる基礎疾患プロセスに効果を有しないという事実である。究極的に、焦点は、薬理学がもはや基底神経節ドパミンの消失をもはや補償し得ない所まで達したように見える。(同上)。

【0004】

アルツハイマー病(AD)は、基底前脳、大脳皮質および他の脳領域からの細胞の進行性消失によって特徴付けられる変性プロセスによるものである。アセチルコリン伝達ニューロンおよびそれらの標的神経が、特に冒される。老人斑および神経細線維のもつれが存在する。ピック病は、アルツハイマー病と類似の臨床的状況を有するが、幾分より緩徐な臨床的経過と限局性の萎縮を有し、主として前頭葉および側頭葉を冒す。アルツハイマー病および他の痴呆に関する1つの動物モデルは、そのような斑の形成に対する遺伝的傾向を発揮する。医薬がモデルで効果を有するならば、アルツハイマー病およびピック病の少なくとも幾つかの形態で有利であるかもしれないと考えられている。現在、緩和する治療法はあるが、機能を回復する手段はない。

【0005】

一群の変性疾患が、小脳、脳幹、脊髄および末梢神経、および時として基底神経節の変性による進行性運動失調によって特徴付けられる。これらの症候群の多くは、遺伝性である；他は、散発性に起こる。脊髄小脳変性は、理論的に3群に分けられる：脊髄支配的運動失調、小脳性運動失調および多重系変性。今日まで、治療法はない。フリートライヒ運動失調は、その遺伝形質が常染色体劣性形質である原型の脊髄性運動失調である。原因遺伝子は、染色体9に見い出された。症状は、不安定歩行とともに5歳から15歳の間に始まり、続いて、上肢運動失調および構語障害が起こる。患者は、反射消失し、大知覚神経線維感覚を失う(振動および位置感覚)。2つの他の疾患が、類似の症状を有する：バッセナーコロンツヴァイク症候群(無 β -リポタンパク血症およびビタミンE欠損症)およびレフスム病(フィタン酸貯蔵病)。小脳皮質変性は、一般に、30歳から50歳の間に起こる。小脳不全の臨床的に唯一の徴候は、病理学的変化が小脳および時として下オリーブに限局して検出され得る。遺伝性および散発性の症例が、報告された。類

似の変性は、慢性アルコール症にも関連し得る。

【0006】

多重系変性では、運動失調は、若年者から中年者の生活において、痙性ならびに錐体外路性、知覚性、下部運動ニューロンおよび自律神経性の不全と様々に組合せて起こる。幾つかの家系では、眼球萎縮、色素性網膜症、眼筋麻痺および痴呆もあり得る。

【0007】

小脳変性の他の形態は、燕麦細胞肺癌、乳癌および子宮癌のような特定の癌とともに起こる腫瘍随伴性小脳変性である。幾つかの症例では、運動失調は、何週から何年までも癌の発見に先行し得る。プルキンエ細胞は、永久に失われ、運動失調を生じる。患者は、癌から永久的に治癒するとしても、彼らが機能する能力は、プルキンエ細胞の損失によって深く機能不全にされる。具体的な治療はない。

【0008】

発作は、ニューロン変性および機能的シナプスの損失も生じる。現在、修復法はなく、一時的軽減方法およびリハビリテーションのみが試みられる。

【0009】

神経移植は、中枢神経系の発生を探索し、パーキンソン病および他の神経変性疾患のような状態における疾病組織の修復のために使用されてきた。胎児組織を脳に直接グラフトすることによるニューロンの実験的置き換えは、幾つかの研究大学(ユニヴァーシティ・オブ・サウスフロリダを含む)で、少数の患者で達成されたが、今までのところ、ヒト胎児ニューロンの実験的移植は、適切な組織源の欠乏、論理的問題、法律적および倫理的束縛、およびヒト宿主脳中での移植されたニューロンの乏しい生存により制限された。

【0010】

1つの方法は、非造血組織のための幹細胞として、骨髄ストロマ細胞を使用することにより、ニューロンを置き換える。骨髄ストロマ細胞は、組織培養プラスチックに接着するそれらの傾向により、骨髄中で他の細胞から単離され得る。細胞は、間葉としておおまかに定義され得る組織に関する幹細胞の特性の多くを有

するが、それは、それらが培養中で、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、および筋芽細胞にさえ分化し得るからである。従って、骨髄ストロマ細胞は、幹細胞の分化を検査するための興味をそそられるモデルを示す。さらに、それらは、細胞および遺伝子治療のために可能性として有用である幾つかの特性を有する。Prockop, D.J. Science: 26:71-74(1997)。骨髄細胞(BMSC)のこのポピュレーションは、樹状細胞を調製するためにも使用され(K. Inabaら、J. Experimental Med. 176:1693-1702(1992))、それは、その名称が含意するように、ニューロンに関して混乱し得る形態を有する。樹状細胞は、T細胞応答の開始に関与する抗原提示細胞のシステムを含む。樹状細胞の産生を刺激する特異的成長因子は、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)であると報告されている。K. Inabaら、J. Experimental Med. 176:1693-1702(1992)。

【0011】

骨髄中の非造血細胞に関する幹細胞の存在は、130年前に、ドイツ人実験病理学者Cohnheimの観察によって、最初に示唆された。J. Cohnheim, Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med. 40:1(1867)。Cohnheimは、不溶性アニリン色素を動物の静脈に注射し、続いて、彼が遠位部位に創った傷中に色素含有細胞の出現を探ることによって、創傷修復を研究した。彼は、創傷中に現れる全てでなくとも殆どの細胞が、血流から及び骨髄との関連により到来すると結論した。染色された細胞は、炎症細胞のみでなく、線維芽細胞様の形態を有し細い筋原線維が関連する細胞もまた含んでいた。従って、Cohnheimの仕事は、骨髄が、創傷修復の通常のプロセスの一部としてコラーゲン線維を沈着する線維芽細胞の源であり得るという可能性を提起した。創傷修復中の線維芽細胞の源は、1867年のCohnheimの報告以来、40以上の文献で調べられてきた。例えば、R. Ross, N.B. Everette, R. Tyler, J. Cell Biol. 44:645(1970); J.K. Moen. J. Exp. Med. 61:247(1935); N.L. Petrakis, M. Davis, S.P. Lusia, Blood 17:109(1961); S. R. S. Rangan, Exp. Cell Res. 46:477(1967); J.M. Davison, INFLAMMATION: BASIC PRINCIPLES AND CLINICAL CORRELATES, J.I. Gallin, I.M. Goldstein, R. Snyderman編(Raven, ニューヨークシティ, 第2版, 1992, pp.809-19; R. Bucala, L.A. Spiegel, J. Chesney, N. Hogan, A. Cerami, Mol. Med. 1:71(1994)を参照)。

殆どのデータは、線維芽細胞が局所的起源のものであるが、組織は消散せず、いまだに調べられていることを示唆する。Prockop, D.J. Science 26:71-74(1997)。

【0012】

Cohnheimの論文は、まだ実証されていないけれども、骨髓が、線維芽細胞ならびに他の間葉細胞に分化し得る細胞を含むという明確な証拠が、1970年代半ばに始まったFriedensteinの草分けの仕事以来、利用可能である。A.J. Friedstein, U. Gorskaja, N.N. Kulagina, Exp. Hematol. 4:276(1976)。Friedensteinは、プラスチック製培養皿に全骨髓のサンプルを入れ、非接着の細胞をすすぎ落とした。接着細胞の最も顕著な特徴は、それらが、骨または軟骨の小さな沈着物に類似するコロニーに分化する能力を有するということであった。Freidensteinの初期の観察は、1980年代の間に、多くの研究者、特にPiersmaおよび同僚によって拡張された(A.H. Piersma, R.E. Ploemacher, k.G.M. Blockbank, Br. J. Haematol. 54:285(1983); A.H. Piersmaら、Exp. Hematol. 13:237(1985))およびOwenと同僚。C.R. Howlettら、Clin. Orthop. Relat. Res. 213:251(1986); H.J. Mardon, J. Bee, k. von der Mark, M.E. Owen, Cell Tissue Res. 250:157(1987); J.N. Beresford, J.H. Bennett, C. Devlin, P.S. Leboy, M.E. Owen, J. Cell Sci. 102:341(1992)。これら及び他の研究(M.E. OwenおよびA.J. Friedenstein、Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues, Ciba Foundation Symp. 136, ワイリー, チチェスター, イギリス, 1988, pp.42-60; S.L. Chengら、Endocrinology 134:277(1994); A.I. Caplan, J. Orthop. Res. 9:641(1991); D.J. Richardら、Dev. Biol. 161:218(1994)。S. Wakitani, T. SaitoおよびA.J. Caplan(Muscle Nerve 18:1412(1995))は、MSCsが、5-アザシチジンおよびアンホテシリンB(Fungasome, Gibco)を用いた処理により、筋芽細胞および筋管に分化することを実証した。D. Phinney(Prockop, D.J. Science. 26:71-74(1997))は最近、アンホテシリンB($1\mu\text{g/ml}$)単独で処理後、細胞が筋芽細胞および筋管に分化することを観察した; A. J. Friedenstein, R.K. Chalakanyan, U.V. Gerasimov, Cell Tissue Kinet. 20:263(1987); A. Keating, W. Horsfall, R.G. Hawley, F. Toneguzzo, Exp. Hematol. 18:99(1990); B.R. ClarkおよびA. Kea

ting, Ann. N.Y. Acad. Sci. 770:70(1995))は、Friedensteinの比較的加工していない手順によって単離された骨髄ストロマ細胞(MSCs)が多重効力性で、骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞、および筋芽細胞にさえ容易に分化することを確立した。

【0013】

MSCsの多重効力特性は、数十年間にわたり認識されてきたけれども、細胞それら自身に関する我々の情報には驚くべき大きなギャップがある。Friedenstein(A. J. Friedenstein, U. Gorskaja, N.N. Kulagina, Exp. Hematol. 4:276(1976))に記載されるように、プラスチックへのそれらの接着によって単離された細胞は、最初は、異種起源でありクローン化するのは困難である。造血細胞の分画は、マウス骨髄の初期の培養物中で比較的が高いが、ヒト骨髄では30%未満である(M. E. OwenおよびA. J. Friedenstein, Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues, Ciba Foundation Symp. 136, ワイリー, チチェスター, イギリス, 1988, pp.42-60; S.L. Chengら、Endocrinology 134:277(1994); A.I. Caplan, J. Orthop. Res. 9:641(1991); D.J. Richardら、Dev. Biol. 161:218(1994); A. Keating, W. Horsfall, R.G. Hawley, F. Toneguzzo, Exp. Hematol. 18:99(1990); B.R. ClarkおよびA. Keating, Ann. N.Y. Acad. Sci. 770:70(1995))。容易に同定可能な造血細胞の殆どは、細胞が2または3週間、一次培養として維持されるにつれて失われる。培養されたMSCは、間隙性タイプIコラーゲン、フィブロネクチン、およびタイプIVコラーゲンおよび基底膜のラミニンを含む細胞外マトリックスを合成する(M. E. OwenおよびA. J. Friedenstein, Cell and Molecular Biology of Vertebrate Hard Tissues, Ciba Foundation Symp. 136, ワイリー, チチェスター, イギリス, 1988, pp.42-60; S.L. Chengら、Endocrinology 134:277(1994); A.I. Caplan, J. Orthop. Res. 9:641(1991); D.J. Richardら、Dev. Biol. 161:218(1994); A. Keating, W. Horsfall, R.G. Hawley, F. Toneguzzo, Exp. Hematol. 18:99(1990); B.R. ClarkおよびA. Keating, Ann. N.Y. Acad. Sci. 770:70(1995))。培養された細胞の小分画は、VII因子関連抗原を合成し、従って、恐らく内皮性である。細胞は、サイトカインを分泌し、その最も重要なものは、インターロイキン7(IL-7)、IL-8、IL-11、および幹細胞

因子(c-キットリガンド)であるように見える。細胞を分化させる条件は、幾分、種依存性であり、使用されるウシ胎児血清のロットのような不完全に定義された変数によって影響される。しかしながら、マウス、ラット、ウサギ、およびヒトからのMSCは、デキサメタゾン、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃、またはBMP-2のようなサイトカインに応答して、骨芽細胞(ヒドロキシアパタイトの形態でミネラルを沈着する)、軟骨細胞(軟骨マトリックスを合成する)、および脂肪細胞のコロニーに、容易に分化する(A.J. Friedenstein, U. Gorskaja, N.N. Kulagina, Exp. Hematol. 4:276(1976):5-51)。アンホテシリンB(Fungasome, Gibco)とともに5-アザシチジンと、またはアンホテシリンB単独と反応させて、S. Wakitani、T. SaitoおよびA.J. Caplan(Muscle Nerve 18:1412(1995))は、5-アザシチジンおよびアンホテシリンBによる処理により、MSCが筋芽細胞および筋管に分化することを実証した。D. Phinney(未公開データ)は、細胞が、アンホテシリンB(1 μ g/mg)単独で処理後、筋芽細胞および筋管に分化し、それらが、リズムカルに鼓動する筋管に融合する筋肉芽細胞に分化することを観察した。

【0014】

MSCの分化に関する殆ど実験は、Friedensteinに記載されるようなMSCの培養物を用いて行なわれた(A.J. Friedenstein, U. Gorskaja, N.N. Kulagina, Exp. Hematol. 4:276(1976))。例えば、1987年12月22日に発行された米国特許第4,714,680号は、ドナーから骨髓を回収する方法を開示している。段階特異的な抗原または未成熟ヒト骨髓細胞を認識するモノクローナル抗体が、提供される。これらの抗体は、ヒト血液からの細胞懸濁液および骨髓移植で使用され得る骨髓を単離する方法において有用である。ヒト多重効力的なリンパ-造血幹細胞を含む細胞懸濁液も、該細胞懸濁液を使用する治療的方法とともに、提供される。

【0015】

幾つかの研究者のグループは、1990年以来、より均一なポピュレーションを調製することを試みた。例えば、1992年2月11日に発行された米国特許第5,087,570号は、均一な哺乳動物造血幹細胞組成物を如何に単離するかを開示している。濃縮された造血幹細胞組成物は、分化した又は特定目的の造血細胞を実質的に含まない。所望の細胞は、特定のマーカーを有する他の細胞の除去によって得られる

。得られた組成物は、個人またはグループの造血血統を提供し、宿主の幹細胞を再構築し、広範囲な造血成長因子のアッセイを同定するのに使用され得る。

【0016】

1997年5月27日に発行された米国特許第5,633,426号は、造血細胞の分化および産生の別の例である。キメラ免疫無防備マウスは、移植の時点から少なくとも4週間のヒト骨髄を与えられた。骨髄は、赤血球を例外として、骨髄の通常のポピュレーションを仮定した。ヒト骨髄を有するこれらのマウスは、ヒト造血細胞の増殖および分化に対する、様々な薬剤の効果を研究するのに使用され得る。

【0017】

1997年9月9日に発行された米国特許第5,665,557号は、マーカーCDw109を発現する細胞の濃縮分画を分離することによる濃縮された造血幹細胞を得る方法に関する。造血巨核球始原細胞が濃縮された組成物を得る方法も提供される。幹細胞およびそれから得られる細胞ポピュレーションに関して濃縮された組成物も、本発明により提供される。細胞の使用方法も、含まれる。

【0018】

1995年6月5日に発行された米国特許第5,753,505号は、分化の更に別の方法である。原始的組織が、免疫不全宿主に導入され、そこでは、原始的組織が発生し分化する。キメラ宿主は、組織の増殖および分化に対する様々な薬剤の効果ならびに、増殖および分化に関与する薬剤の同定をテストする、異種組織のプロセスおよび発生を調査を可能にする。

【0019】

1998年5月19日に発行された米国特許第5,753,505号は、約90%超の哺乳動物の、非腫瘍由来の、ニューロン先祖細胞を含む単離された細胞組成物を提供し、該先祖細胞は、ニューロン特異的マーカーを発現してニューロン細胞に分化し得る先祖を生じ得る。この細胞組成物を利用する、ニューロン性疾患を治療する方法も提供される。

【0020】

1996年8月6日に発行された米国特許第5,759,793号は、磁性的に安定化された流動床を利用する細胞ポピュレーションの混合物からの少なくとも1種の哺乳動

物細胞ポピュレーションの陽性および陰性両方を選択する方法を提供する。この方法の1つの用途は、造血細胞の分離および精製である。標的細胞ポピュレーションは、ヒト幹細胞を含む。

【0021】

1998年8月4日に発行された米国特許第5,789,148号は、細胞分離のためのキット、組成物および方法を開示している。該キットは、遠心分離可能な容器、および密度勾配分離に好適でポリラクタムを含みイオン化照射で処理して滅菌された、有機シラン化シリカ粒子に基づく細胞分離懸濁液を含む。組成物は、細胞分離のためのシラン化シリカ粒子に基づく懸濁液を含み、該懸濁液は少なくとも0.05%のポリラクタムを含み、好ましくはイオン化照射で処理される。血液細胞混合物から、稀な血液細胞を単離する方法も開示されている。

【0022】

過去数年以内に、MSCは、細胞治療および遺伝子治療の両方のためのビヒクルとして調査された。細胞は、局所麻酔下で得ることができる骨髓の小さな吸引物から単離するのが比較的容易である；それらは、培養中で拡大すること及び外来遺伝子でトランスフェクトするのにも比較的容易である。Prockop, D.J. Science 26:71-74(1997)。従って、MSCは、遺伝子治療で使用するために、造血幹細胞(HSCs)にまさる幾つかの利点を有するよう見える。十分な数のHSCsの単離は、大きい容量の骨髓(1リットル以上)を要求し、細胞は、培養中で拡大するのが困難である。(Prockop, D.J.(上記))。

【0023】

患者自身の骨髓、MHCがマッチする血縁者または他人の骨髓、骨髓バンク、および臍帯血バンクを含む、骨髓組織に関する幾つかの源がある。この源を包含する幾つかの特許がある。1994年5月17日に発行された米国特許第5,476,997号は、ヒト骨髓等価物を産生する方法を開示している。ヒト造血システムは、免疫無防備哺乳動物宿主において提供され、そこでは、造血システムは、延長された期間機能的である。特に、ヒト胎児肝組織およびヒト胎児胸腺が、若い免疫無防備マウスに、血管系を供給された部位で導入され、それにより、胎児組織は、機能的なヒト骨髓組織の形成をもたらす。

【0024】

最も倫理的に議論のある移植可能なニューロンの源は、ヒト胎児組織のものである。1997年11月25日に発行された米国特許第5,690,927号も、ヒト胎児組織を利用する。ヒト胎児ニューロン由来の細胞系を、宿主組織に移植する。該方法は、様々な神経学的疾患および他の疾患の治療を可能にする。好ましい細胞系は、SVGである。

【0025】

1998年5月19日に発行された米国特許第5,753,491号は、宿主に遺伝的に関連しない細胞を移植することにより、宿主を治療する方法を開示している。より詳細には、該発明は、ヒト胎児神経由来細胞系、およびこれらの不死化ヒト胎児神経由来細胞をホストに移植することによるホストを治療する方法を提供する。1つの源は、マウスであり、それは、1996年12月3日に発行された米国特許第5,580,777号に含まれている。この特許は、ニューロンおよび／またはグリア細胞の特性を有する細胞系を含む不死化神経前駆細胞の系のインビトロ産生方法を特徴とし、神経上皮または神経堤細胞を、mycファミリーのオンコジーンのメンバーを担持するレトロウイルスベクターで感染させる工程を包含する。

【0026】

1998年5月19日に発行された米国特許第5,753,506号は、それにより哺乳動物胚神経上皮(CNS幹細胞)からの多重効力前駆細胞の均一なポピュレーションが、ニューロン、稀突起神経膠細胞、および星状神経膠細胞に分化するそれらの多重効力能力を維持しながら培養中で 10^9 倍まで拡大するインビトロ手順を明示している。幹細胞から多数のニューロンを拡大するための化学的条件が、示されている。さらに、有意により高い割合のニューロン、星状神経膠細胞、または稀突起神経膠細胞を個々に生じる4つのファクター—PDGF、CNTF、LIF、およびT3—が同定された。これらの手順は、哺乳動物CNS幹細胞、ニューロン、星状神経膠細胞および稀突起神経膠細胞の大規模な調製を可能にするよう意図されている。これらの細胞は、神経学的疾患のための多くの細胞に基づく、および遺伝子に基づく治療のための重要なツールとして提案されている。

【0027】

幹細胞の別の源は、霊長類の胚幹細胞である。1998年12月1日に発行された米国特許第5,843,780号は、これらの幹細胞を利用する。幹細胞の精製された調製物が、開示されている。この調製物は、次の細胞表面マーカーによって特徴付けられる：SSEA-1(-)；SSEA-3(+)；TRA-1-60(+)；TRA-1-81(+)；およびアルカリ性ホスファターゼ(+)。1つの実施態様では、調製物の細胞は、正常の核型を有し、11ヶ月間連続培養後、未分化状態で増殖し続ける。胚幹細胞系は、栄養膜を形成し、3つの胚性胚芽層(内胚葉、中胚葉および外胚葉)全てに由来する組織に分化する能力を維持するものとしても記載されている。霊長類の胚幹細胞系を単離する方法も、該特許に開示されている。

【0028】

要約すると、動物モデルおよびヒト患者の両方において、神経移植が、神経変性疾患および発作の治療に対して、並びに脳および脊髄の外傷的損傷の修復のための科学的に実行可能で臨床的に有望なアプローチであるという実質的証拠がある。にもかかわらず、分化に関する代替的細胞源および新規な戦略が、神経移植の広範な使用を現在制限している多くの倫理的および技術的束縛を回避するために必要とされる。

【0029】

(発明の開示)

本発明は、患者自身の脳または脊髄に移植(自己移植)するために使用され得るニューロン組織の新規な源を提供する。本発明は、従って、プールされた胎児組織を使用する微妙な問題を迂回し、さらに免疫抑制の必要性も取り除く。本発明は、同種移植(或る個体から他の個体への骨髄由来ニューロン細胞の移植)および異種移植(或る種から他の種への骨髄由来ニューロン細胞の移植)のためにも使用される。単純に述べると、骨髄細胞は、インビトロおよびインビボで、ニューロンとなるように誘導され得る。該概念も該技術も、これまで報告も遂行もされなかった。

【0030】

1つの実施態様では、哺乳動物の脳または脊髄に移植されるのに好適な、非胎児性で、非腫瘍原性の、骨髄由来ニューロン細胞が開示される。

【0031】

別の実施態様では、骨髓からニューロン様細胞を得るための新規な方法が開示され、該方法は、a)骨髓細胞を得る工程；b)骨髓ストロマ細胞を選択する工程；c)ストロマ細胞を分化剤とともに、細胞表現型をニューロンに変化させるのに十分な時間インキュベートする工程、を包含する。該方法は、造血幹細胞を分離する更なる工程を包含し得る。骨髓ストロマ細胞を選択する方法は、骨髓細胞および好適な培養培地をプラスチック製の培養培地容器に入れ、骨髓ストロマ細胞をプラスチックに接着させ、および培地を交換することにより他の細胞を除去することを包含し得る。該方法は、レチノイン酸、成長因子、胎児ニューロン細胞またはそれらの組合せの分化剤としての使用も提供する。成長因子は、BDNF、GDNFおよびNGFを含む。レチノイン酸は、9-シスレチノイン酸、全トランスレチノイン酸(all-transretinoic)またはその組合せである。

【0032】

個体自身の骨髓から自己移植するためにニューロンを得る方法は、a)骨髓を回収する工程；b)骨髓ストロマ細胞を選択する工程；c)移植のための十分な細胞ができるまで、骨髓ストロマ細胞をマイトジェンを含む培地中でインキュベートする工程；d)工程c)のストロマ細胞を、分化剤とともに、細胞表現型がニューロンおよび/またはグリアに変化するのに十分な時間インキュベートする工程を包含する。マイトジェンは、EGF、PDGFまたはその組合せである。該方法は、造血幹細胞を分離する更なる工程を含み得る。骨髓ストロマ細胞を選択する方法は、骨髓細胞および好適な培養培地をプラスチック製培養培地容器に入れ、骨髓ストロマ細胞をプラスチックに接着させ、培地を交換することにより他の細胞を除去することを包含し得る。

【0033】

分化剤は、レチノイン酸、成長因子、胎児ニューロン細胞またはそれらの組合せから選択される。成長因子は、BDNF、GDNFおよびNGF、またはそれらの組合せである。レチノイン酸は、9-シスレチノイン酸、全トランスレチノイン酸(all-transretinoic)またはその組合せである。

【0034】

上記の方法により発生される骨髄ストロマ細胞の細胞系も開示され、その結果、細胞は、それらがその領域に代表的なニューロン細胞に分化し、特異的な構築パターンに統合する特異的な神経解剖学的領域に移動し局在する能力を有する。

【0035】

さらに、骨髄を得るのに好適なシリンジ、脱水された培養培地を有するプラスチック製フラスコ；および骨髄幹細胞を有する、ニューロン細胞移植のためのキットも開示される。

【0036】

さらに、前記神経変性疾患を有する個体に上記方法により産生された細胞の充分量を投与することを包含する、神経変性疾患を治療する方法が開示される。具体的な神経変性疾患は、パーキンソン病、アルツハイマー病、虚血、脊髄損傷、運動失調、およびアルコール症を含む。

【0037】

別の実施態様は、ヒトのニューロン細胞に対する物質の効果をスクリーニングする方法である。該方法は、移植されたヒトニューロン細胞を有する哺乳動物を提供すること、該細胞は、哺乳動物の脳内の少なくとも1つの特異的領域に移動する；哺乳動物に該物質を投与すること；および哺乳動物を物質の効果に関して観察することを要求する。

【0038】

(好ましい実施態様の説明)

古代中国の医事的格言「脳は骨髄の海である」(W.R. Morse, Chinese Medicine, Paul Hoeber, Inc., ニューヨーク, 1938)は、実験条件下でニューロンに分化する骨髄細胞のポピュレーションの能力に関する最近の研究知見と共鳴する。

【0039】

西洋医学では、骨髄中の非造血幹細胞の存在は、100年以上前に示唆されたが、骨髄ストロマ細胞の単離および骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞および筋芽細胞への分化は、最近実証されたばかりである。D.J. Prockop, Science 276:71-74(1997)。医学文献では、骨髄ストロマからの非造血前駆体は、コロニー形成単位線維芽細胞、間葉幹細胞または骨髄ストロマ細胞(BMSC)と称される。BMSCは、

骨、軟骨および脂肪の周囲組織の源となることが自然に予測され得るけれども、幾つかの最近の報告は、これらの細胞が特異的実験条件下で、移動し筋肉またはグリア細胞に分化し得ることを明示している。BMSCの照射された3週齢マウスへの全身的注入は、脳を含む様々な非造血組織におけるドナー細胞の子孫の出現を生じた。R.F. Pereiraら、Proc. Natl. Acad. Med. (U.S.A.)95:1142-1147(1998)。遺伝子的に標識された骨髄細胞の免疫不全マウスへの移植は、化学的に誘発された筋肉変性の領域への骨髄細胞の移動を生じると報告された。G. Ferrariら、Science 279:1528-1530(1998)。これらの骨髄に由来する細胞は、筋原性分化を受け、損傷された筋肉繊維の再生に参画した。さらに、ヒトBMSCのラット線条への注入は、細胞の植え付け(engrafting)、移動および生残を生じた。S.A. Aziziら、Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)95:3908-3913(1998)。植え付けの後、これらの細胞は、コラーゲンおよびフィブロネクチンに対する抗体への免疫応答性のような、代表的BMSCマーカーを失った。BMSCは、星状神経膠細胞の多くの特性を発生し、それらの植え付けおよび移動は、コラーゲンを産生し続け移植後にグリオシスを受ける線維芽細胞と顕著に対照的である。致死的に照射されたラットへの骨髄の移植後、骨髄に由来する細胞は、知覚および自律神経神経節ならびに末梢神経において、ホストのマクロファージの60~80%に置き換わることが見出された。K. Vass, W.F. Hickey, R.E. Schmidt, H. Lassman, Laboratory Investigation 69:275-282(1993)。その研究では、骨髄細胞がグリアまたはニューロン細胞に分化するかどうか決定する試みは為されなかった。

【0040】

我々の研究室は、最近、レチノイン酸、成長因子、および胎児ニューロン環境の組合せを用いて、BMSCをニューロン様表現型に分化させることに成功した。さらに、我々は、BMSCを脱神経化ラット線条に移植し、BMSCが特異的な神経解剖学的領域に移動し、そこでそれらが、隣接細胞のマーカーを発現する細胞に分化することを見出した。それらの領域では、細胞は、特徴的な構築パターンに統合する。

【0041】

定義：

「ニューロン細胞」は、1種以上のニューロンマーカーを染色するような、ニューロン表現型の少なくとも1つの表示を有するものである。ニューロンマーカーの例は、ニューロン特異的核タンパク質、チロシンヒドロキシラーゼ、微小管関連タンパク質、およびカルビンジン(calbindin)を含むが、それらに限定されない。

【0042】

「非腫瘍原性」は、細胞が新生物または腫瘍を生じない事実を指す。

【0043】

本明細書中で使用されるように、「非胎児性」は、源が生まれていた事実を指す。それは、臍帯血を排除しない。

【0044】

骨髄ストロマ細胞を選択することは、多くの方法で為され得る。古典的には、ストロマ細胞は、プラスチック製容器中でばらばらになり培養される。ストロマ細胞は、特異的培地中でのそれらの生残およびプラスチックへの接着によって分離される。

【0045】

骨髄細胞は、下記でインビトロおよびインビボ観察により実証されるように、多くの異なるニューロン表現型を採用するように誘導され得る。さらなるインビトロ分化技術は、当分野で公知の様々な細胞成長因子および同時培養技術の使用により適合化され得る。胎児の中脳または線条細胞(下記で成功裏に実施される)と同時培養することに加えて、アクセサリー細胞、セルトリ細胞ならびに胎児および成人の中枢神経系の他の部分からの細胞を含むがそれらに限定されない様々な他の細胞が使用され得る。

【0046】

一般的方法

当分野で公知であり、具体的には記載されていない標準的分子生物学的技術は、Sambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク(1989, 1992)およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、John Wiley and Sons、ボルチモア、メリーランド(1989

に一般に従う。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を、PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, Academic Press、サンジエゴ、カリフォルニア(1990)のように一般に行なう。他の核酸技術に関連する反応および操作は、他に言及がなければ、Sambrookら、1989、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Pressに一般的に記載され、および米国特許第4,666,828号、第4,683,202号；第4,801,531号；第5,192,659号；および第5,272,057号に記載される方法論のように行なわれ、本明細書中に参考として援用されている。フローサイトメトリーと組合せたin-situ PCRは、特異的DNAおよびmRNA配列を含む細胞の検出のために使用され得る(Testoniら、Blood 87:3822(1996))。

【0047】

当分野で公知であり具体的には記載されていない免疫学の標準的方法は、Stitesら(編)、BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY、第8版、Appleton & Lange、ノーウォーク、コネチカット(1994)；並びにMishellおよびShigi(編)、SELECTED METHODS IN CELLULAR IMMUNOLOGY, W.H. Freeman and Co., ニューヨーク(1980)に一般に従う。

【0048】

イムノアッセイ

一般に、イムノアッセイは、標本を細胞表面マーカーなどについて評価するために使用される。免疫細胞化学アッセイは、当業者に周知である。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の両方とも、アッセイで使用され得る。適切な場合は、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA)のような他のイムノアッセイが、当業者に公知のように使用され得る。利用可能なイムノアッセイは、特許および科学文献に広く記載されている。例えば、米国特許第3,791,932号；第3,839,153号；第3,850,752号；第3,850,578号；第3,853,987号；第3,867,517号；第3,879,262号；第3,901,654号；第3,935,074号；第3,984,533号；第3,996,345号；第4,034,074号；第4,098,876号；第4,879,219号；第5,011,771号および第5,281,521号ならびにSambrookら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1989)を参照。

【0049】

抗体産生

抗体は、モノクローナル、ポリクローナルまたは組換えであり得る。好都合には、抗体は、免疫原またはその一部、例えば、配列に基づく合成ペプチドに対して調製され、またはクローニング技術によって組換え的に調製され得、または天然の遺伝子産物および／またはその部分が単離され免疫原として使用され得る。

【0050】

免疫原は、HarlowおよびLane, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1988)およびBorrebæck, ANTIBODY ENGINEERING—A PRACTICAL GUIDE, W.H. Freeman and Co.(1992)に一般に記載されるように、当業者に周知の標準的抗体産生技術により抗体を産生するために使用され得る。抗体フラグメントは、抗体からも調製され、当業者に公知の方法によるFabおよびF(ab')₂を含み得る。

【0051】

ポリクローナル抗体を産生するために、ウサギまたはヤギのような宿主を、一般にはアジュバントと共に、必要なら担体と結合して、免疫原または免疫原フラグメントで免疫し；免疫原に対する抗体を血清から集める。さらに、ポリクローナル抗体は、それがモノ特異的であるように、吸収され得る。即ち、血清は、交叉反応性抗体が血清から除かれ、それをモノ特異的にするように、関連する免疫原にさらされ得る。

【0052】

モノクローナル抗体を産生するために、好適なドナーを免疫原、一般にはマウスで過剰免疫し、脾臓の抗体産生細胞を単離する。これらの細胞は、ミエローマ細胞のような不死化細胞に融合され、不死であり要求された抗体を分泌する融合細胞ハイブリッドを提供する。続いて、細胞を培養し、モノクローナル抗体を培養培地から回収する。

【0053】

組換え抗体を産生するために、動物またはハイブリドーマの抗体産生Bリンパ球からのメッセンジャーRNAを逆転写して、相補性DNA(cDNA)を得る。抗体cDNAは、全長または部分長であり得、増幅され、ファージもしくはプラスミドにクロー

ン化される。cDNAは、重鎖または軽鎖cDNAの部分長であり、分離され又はリンカーにより連結され得る。抗体、または抗体フラグメントは、好適な発現システムを用いて発現される。抗体cDNAは、関連する発現ライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることもできる。

【0054】

抗体は、固体支持体基材に結合され又は検出可能な部分に複合体化され、或いは、両方とも、当分野で周知のように結合され及び複合体化され得る（蛍光または酵素部分の複合体化の一般的議論のために、Johnstone & Thorpe, IMMUNOCYTOCHEMISTRY IN PRACTICE, Blackwell Scientific Publications, オックスフォード, 1982を参照）。抗体の固体支持体基材に対する結合も、当分野で周知である。（一般的議論に関しては、Harlow & Lane ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory Publications、ニューヨーク(1988)およびBorrebäck, ANTIBODY ENGINEERING—A PRACTICAL GUIDE, W.H. Freeman and Co.(1992)を参照）。本発明に包含される検出可能な部分は、蛍光、金属、酵素および放射性マーカーを含み得るが、それらに限定されない。例は、ビオチン、金、フェリチン、アルカリ性ホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、ウレアーゼ、フルオレセイン、ローダミン、トリチウム、 ^{14}C 、ヨウ素化および緑色蛍光タンパク質を含む。

【0055】

遺伝子治療

本明細書中で使用される遺伝子治療は、興味ある遺伝子物質（例えば、DNAまたはRNA）を遺伝的または後天的疾患または状態を治療または予防すべき宿主に転移することを指す。興味ある遺伝子物質は、そのインビボ産生が所望される生成物（例えば、タンパク質、ポリペプチド、およびペプチド、機能的RNA、アンチセンス）をコードする。例えば、興味ある遺伝子物質は、治療的価値のあるホルモン、レセプター、酵素、ポリペプチドまたはペプチドをコードする。或いは、興味ある遺伝子物質は、自殺遺伝子をコードする。総説のために、"Gene Therapy" ADVANCES IN PHARMACOLOGY 40, Academic Press, サンジエゴ、カリフォルニア、1997を参照。

【0056】

細胞のデリバリー

本発明の細胞は、優れた医学的実践に従い、個々人の患者の臨床的状态、投与される部位および方法、投与スケジュール、患者年齢、性別、体重および医師に公知の他のファクターを考慮に入れて、投与され服用される。本明細書の目的のための薬学的「有効量」は、従って、当分野で公知のような考慮すべき問題によって決定される。量は、改善された生残率またはより迅速な回復、或いは症状の改善もしくは除去および当業者により適切な手段として選択されるような他の指標を含むが、それらに限定されない。

【0057】

本発明の方法では、本発明の細胞は、非経口投与、クモ膜下腔投与、脳室内投与および黒質内投与を含むがそれらに限定されない中枢神経系にインプラントするのに適切であるように様々な方法で投与され得る。

【0058】

(実施例)

実施例1. インビトロ分化

骨髄は、マウス大腿骨またはヒト骨髄吸引物から得た。ヒト骨髄を、ダルベッコ最少必須培地(DMEM)(GIBCO/BRL)および10%ウシ胎児血清(FBS)で1:1に希釈し、密度勾配(Ficoll-Paque Plus, 1.077g/ml, Pharmacia)で30分間1,000gで遠心分離した。上清および界面を合せ、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むMEMで約20mlに希釈し、ポリエチレンイミンでコートされたプラスチック製フラスコにプレートした。マウス骨髄を、10ml PBSおよび5%ウシアルブミンに入れた。細胞を、この培地中で洗浄し、2000rpmで5分間遠心分離した。細胞を、2mMグルタミン、0.001%β-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸および10%ウマ血清を補足されたDMEMからなる増殖培地中に再懸濁した。細胞を、フラスコ中で2日間インキュベートし、その後、培地を交換することにより非接着細胞を除去した。培養物が、コンフルエントに達した後、トリプシン(0.25%)および1mM EDTAを適用し、37℃で3-4分間インキュベートすることにより、細胞をリフトした。幾つかの細胞を、後に使用するために凍結した。細胞ポピュレーションを拡大するために、10

ng/mlの濃度の上皮成長因子(EGF)または5ng/mlの濃度の血小板由来成長因子(PDGF)のようなマイトジェン添加により1:2または1:3希釈した後、他の細胞を再プレートした。この手順を、3-5継代繰返した。

【0059】

BMSC細胞のニューロン様細胞への分化は、次の工程であった。上記のようにプラスチック製フラスコ底から除去された細胞は、5%BSA、1%FBS、トランスフェリン(100g/ml)、プトレシン(putrescine)(60 μ M)、インシュリン(25g/ml)、プロゲステロン(0.02 μ M)、セレンウム(0.03 μ M)、9-シスレチノイン酸または全トランスレチノイン酸(0.5 μ M)、および1-10ng/mlの濃度の幾つかのニューロン成長因子の任意の1つを補足されたニューロン成長培地(N5)(Kaufman & Barrett, Science 220:1394, 1983)の存在下に、35mm培養皿中で再プレートされた。テストされた成長因子は、脳由来成長因子(BDNF)、グリア由来神経栄養因子(GDNF)および神経成長因子(NGF)であった。7-14日後、少部分のBMSCは、形態を変化させ、ネスチン(神経細胞になるよう運命づけられた細胞のマーカー)、ニューロン特異的核抗原(NeuN)、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)およびグリア原線維酸性タンパク質(GFAP)のようなタンパク質を発現した。4%もの細胞が、免疫組織化学的に可視化されたとき、ニューロン様またはグリア細胞形態を発生した。これらの細胞は、CD40に関する染色の欠如によって実証されるように、「樹状細胞」に分化しなかった。

【0060】

	BMSC由来細胞の染色特性			
	NeuN	GFAP	TH	CD40
BDNF	+++	+	++	—
GDNF	++	+	+	—
NGF	+	+	+	—

実施例 2

骨髓細胞を、胚性幹(ES)細胞の分化を促進するのに使用されるものと類似の方法を使用して、インビトロでニューロン様細胞になるように誘導した。J. Dinsmoreら、Cell Transplantation 5:131-143(1996)。骨髓を、成熟ラットから得て

、磁気細胞ソーティングを用いて2分画に分割した。最初に、#26Gニードルを有するシリンジを用いて、シャフトを緩衝液(0.5%BSAを補足したPBS、pH7.2)でフラッシュすることにより、マウス大腿骨および脛骨から、骨髓細胞を集めた。細胞を、穏やかなピペッティングを数回することにより、バラバラにした。細胞を30 μ mナイロンメッシュを通して、組織の残りの集塊を除去した。緩衝液を加え、10分間200Xgで遠心分離し、上清を除去することにより、細胞を洗浄した。細胞ペレットを、10⁸個の細胞に関して800 μ Lの緩衝液中に再懸濁した。磁気細胞ソーティング・キット(Milteny Biotec, Inc, アウバーン、テキサス)を用いて、造血骨髓細胞をSca1+マイロビーズで標識した。標識された骨髓細胞を、Sca1+細胞の陽性選択のために、MS+カラム上に置いた。

【0061】

具体的には、10⁸個のトータル細胞当り、200 μ LのSca1マルチソート・マイクロビーズを加え、15分間6-12℃で混合およびインキュベートした。1つの分画を、マウス造血幹細胞抗原(Sca1)に関するマーカーを担持する細胞で濃縮し、第2分画を全ての他の骨髓細胞(BMSC分画を含む)から構成されるものとした。細胞を、標識量の緩衝液の5-10Xを加えて洗浄し、10分間200xgで遠心分離し、上清を取り除いた。細胞ペレットを、500 μ Lの緩衝液に再懸濁した。MS+/RS+カラムを、500 μ L緩衝液で洗浄した。細胞懸濁液をカラムに適用し、陰性細胞を通過させた。続いて、カラムを、500 μ L緩衝液で3回リンスした。カラムをセパレータ(それは、磁石を含む)から除去し、好適な採集管上に置いた。1mlの緩衝液をカラム上にピペットし、カラムに備えたプランジャーを用いて、陽性分画をフラッシュアウトした。Sca1標識された細胞を、10ml PBSおよび5%BSA中に入れた。細胞を、この培地中で洗浄し、遠心分離した(2000rpmで5分間)。2mMグルタミン、0.001% β -メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、および10%ウマ血清を補足したDMEMからなる増殖培地に、細胞を再懸濁した。細胞を、ポリエチレン製フラスコ中で2日間インキュベートし、培地を交換することにより非接着細胞を除去した。培養物がコンフルエントに達した後、トリプシン(0.25%)および1mM EDTAで37℃で3-4分間インキュベーションして細胞をばらばらにした。次に、それらを、後で使用するために凍結するか、或いは上皮成長因子(EGF)、10ng/mlを加えて1

：2または1：3希釈した後で再プレートした。培養フラスコの底に強固に接着した細胞のポピュレーションは、主として線維芽細胞のように見えた。これらの細胞の大部分は、フィブロネクチンに対する抗体で染色した。これらの細胞は、それらの間葉または線維芽細胞的外見ゆえに間葉幹細胞と、またはそれらが骨髄中で見い出される支持構造の複雑なアレーから生じるように見えるので骨髄ストロマ細胞(BMSC)と、称された。D.J. Prockop, Science 276:71-74(1997)。

【0062】

我々の実験室での予備的知見は、レチノイン酸(RA)および成長因子(BDNF、GDNFまたはNGF)とともに培養されたBMSC中の樹状細胞に関する証拠を見出し得なかった(実施例1)。さらに、フィブロネクチン免疫応答細胞の数は、RAおよび成長因子による処理の関数として減少し、レチノイン酸および成長因子が線維芽細胞表現型とは違ったBMSCの分化を誘発したことを明示した(図1を参照)。

【0063】

細胞環境がこれらの細胞の分化に影響するかどうか決定するために、BMSCを胎児中脳細胞とともに同時培養した。BMSCは、トランスジェニックlacZマウス(Jackson Labs.)から得られたもので、該マウスは骨髄細胞中で β -ガラクトシダーゼ(β -gal)を発現する。lacZ BMSCは、先に記載されたように(J.R. Sanchez-Ramos, P. Michel, W.J. Weiner, F. Hefti, Journal of Neurochemistry 50:1934-1944(1988))、シス-9レチノイン酸($0.5 \mu\text{M}$)およびBDNF(10ng/ml)を含む培養培地中で、他の株のマウス(C57 b16; Jackson Labs)から調製した胎児中脳細胞と等しい割合でプレートされた。2週間後、ニューロンマーカーに関する β -gal組織化学および免疫細胞化学のために、培養物を固定して処理した。lacZ BMSCからの β -gal+を、明視野顕微鏡下に可視化された青い反応産物によって明確に同定し(図2A、2Cおよび2E中の暗く標識された細胞)、ニューロンをフルオレセイン結合二次抗体を用いて、ニューロン特異的核タンパク質免疫応答性(NeuN-ir)によって同定した。図2B、2Dおよび2Fは、図2A、2Cおよび2Eそれぞれと対応するNeuN-ir画像である(白で標識された細胞)。図2Aでは、1、2および3と番号付けされた細胞は、 β -gal+細胞であり、図2Bに示されるように、Neu-irで同時標識される。ニューロン様プロセスを有する多くの紡錘形状細胞は、 β -gal染色およびNeu

un-irの両方を示したが、胎児中脳細胞からのニューロンは、それらがより大きく β -gal+ではなかったもので、区別可能であった。例えば、図2Eでは、番号1上の細胞は、 β -gal染色を示さないが、図2F中のNeuN-irを示し、従って、胎児中脳ニューロンである。対照的に、図2Eでは、2～6と番号付けられた細胞は、NeuN-irを示す β -gal+BMSC由来細胞であったし(図2F)、従って、ニューロン様細胞となった。これらの結果は、ニューロンの環境ならびに適切な分化/成長因子が、BMSCの大部分のニューロン表現型への形質転換を誘発することを示した。

【0064】

実施例3．インビボ分化

BMSC細胞のニューロンへの分化がインビボで起こるかどうか決定するために、lacZマウスからのBMSCを、除神経または正常のラット線条に移植した。移植する前、BMSCを2日間、シス-9レチノイン酸($0.5\mu\text{M}$)またはBDNF(10ng/ml)で処理した。移植する3週間前、ラットの尾状/被殻の移植部位を、6-ヒドロキシドパミン(6-OH DA)の片側黒質内注射で処理した。6-OH DA(Sigma; $2.5\mu\text{L}$, $3.6\mu\text{g}/\mu\text{L}$ を0.2%アスコルビン酸中トータル用量 $9\mu\text{g}$ に関して)の単回注射を、右上行中央線条ドパミン作動系(後部からブレグマまで 4.4mm , 硬膜まで側部に -1.2mm および腹側に -7.8mm 、ツースバー(Toothbar)により -2.4mm にセット)に行なった。6-OH DAを、速度 $1\mu\text{L}/\text{分}$ でデリバリーした。シリンジを、ゆっくり引き抜く前に、さらに5分間適所に維持した。

【0065】

BMSC懸濁液アリコートをして、6匹の動物中で6-OH DA黒質病変と同側で、単一ニードル路に沿って線条中に沈着した。ラットを、ペントバルビタールナトリウムで麻酔し、定位フレームに置いた。細胞懸濁液アリコートをして、単一ニードル路に沿って線条中の2つの別々の部位に沈着した。注射の座標は、ツースバーを0にセットして前部からブレグマまで 1.2mm , 硬膜まで側部に $+2.7\text{mm}$ および腹側に -5.2mm および -4.7mm であった。 $2\mu\text{L}$ のそれぞれの注射を、速度 $1\mu\text{L}/\text{分}$ でデリバリーした。線条中に注射された幹細胞の数は、トータル80,000細胞に関して20,000細胞/ μL であった。2匹のラットでは、細胞の2回目の注射を非病変側の線条中に行なって、ラット当たりトータル160,000細胞を生じた。

【0066】

移植してから1、2および3ヶ月後、動物の対を犠牲にし、ヘパリン化食塩水およびリン酸緩衝パラホルムアルデヒドで灌流した。 $30\mu\text{m}$ 厚の連続的クリオスラット切片標本を、脳の全長にわたってカットした。切片を、最初に $\beta\text{-gal}$ 活性に関して染色し、続いて、ニューロン特異的核タンパク質(NeuN)に対する抗体、非特異的免疫標識を減少させる幾つかのブロック剤ならびにペルオキシダーゼおよび赤茶色クロマゲンと結合させた第2抗体(Histomouse Kit, Zymed)を用いて免疫組織化学処理を行なった。他のニューロンマーカーは、免疫組織化学的に含められたチロシンヒドロキシラーゼ(TH)、グルタメートデカルボキシラーゼ(GAD)、カルビンジン、および微小管関連タンパク質(MAP2)を評価した。

【0067】

動物は、犠牲にする時間まで通常どおりに行動し、歩行していた。この実験は、移植片が生残り分化するかどうか決定するように特にデザインされていたので、6-OH DA病変およびその後の移植が回転挙動を変化させるかどうか決定するために、動物をアポモルフィンまたはアンフェタミンでチャレンジしなかった。脳組織切片の検査は、線条体中の移植部位から遠い複数の脳領域中のBMSC由来 $\beta\text{-gal}$ +細胞を明示した。 $\beta\text{-gal}$ +細胞の秩序立った蓄積は、次の特異的脳領域に見出された：嗅球の僧帽状細胞ゾーン、視床下部の室傍核および視索上核、海馬、小帯、動眼神経核、赤核、黒質、外転、顔面および舌下脳神経核、延髄の下オリブ、脊髄の前角および小脳プルキンエ細胞層。 $\beta\text{-gal}$ +細胞の分布は、黒質を除く全ての領域で、両側性で殆ど対称であり、黒質では、非病変側は、より多数の $\beta\text{-gal}$ +細胞を示した(図3A、黒色細胞、および表I)。 $\beta\text{-gal}$ + BMSC細胞は、プルキンエ細胞のそれと同一の積層パターンで、小脳中に分布していた(図4A、4B、4C)。BMSCと類似するが、密度がより低い層状分布は、嗅球の僧帽細胞層に見られた。大脳皮質および線条体は、移植の部位であっても、有意な数の $\beta\text{-gal}$ +細胞を蓄積しなかったが、これらの細胞は、それらの領域の毛細管チャンネルで一般に見られた。

【0068】

BMSC $\beta\text{-gal}$ +細胞は、複数の表現型を仮定し、それらには、脈絡叢中の上皮様

立方体様細胞、視交叉および皮質下白質中の小さい稀突起神経膠細胞様細胞、赤核、黒質中、および脳幹運動核中の大ニューロン様細胞を含む。

【0069】

【表1】

中脳領域での細胞カウント

BMSC移植から1ヶ月後(2匹のラットからのカウントの平均)

中脳領域	NeuN-irおよび β -galで同時標識 されたトータル細胞	領域中の トータル β -gal細胞	NeuN-irで 標識された β -gal細胞の%
赤核(R)	3502	3938	88.9
赤核(L)	3405	4410	77.2
第3神経核(R)	575	696	82.6
第3神経核(L)	494	769	64.2
黒質(R)	1534	1907	80.4
黒質(L)	2326	3347	69.5

グラフトから3ヶ月後(2匹のラットからのカウントの平均)

赤核(R)	4658	6092	76.4
赤核(L)	4535	6171	73.5
第3神経核(R)	554	944	58.6
第3神経核(L)	686	1056	64.9
黒質(R)**	0	0	0
黒質(L)**	3745	4372	85.6
VTA(R)**	0	0	0
VTA(L)**	3459	6918	50.0

**これらの領域中のニューロンマーカは、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)であった。左(非病変)側のみが、BMSC由来細胞を含んだ。

中脳領域内の β -gal+細胞の立体解析カウント(トータルおよびニューロンマーカで同時標識された)は、4匹のラットで決定され、その各々は、右黒質に注入された6-OH-DAを用いて予め病変化され、その後、3週間後に右線条体にBMSCを移植された。移植から1ヶ月後に2匹のラットが犠牲にされ、3ヶ月後に2匹のラットが犠牲にされた。黒質および腹側被蓋領域(VTA)中のTH-ir細胞のカウントは、1匹の動物のみで測定された。

【0070】

小脳 β -gal+細胞は、真のプルキンエ細胞のように、カルベジンゲンを発現(図4A

、4Bおよび4C中の真に黒い部分)したが、ニューロンマーカー NeuNを発現しなかった。興味深いことに、正常の(非 β -gal+)プルキンエ細胞も、NeuNを発現しなかった。多くの β -gal+プルキンエ細胞も、GAD-irで同時標識された(図4Dの真の黒)。GADは、 γ -アミノ酪酸(GABA)に関するマーカーであり、それは通常は、プルキンエ細胞中で合成され、深部小脳核中で放出される。GABAも、小脳皮質中の局所的回路ニューロンによって利用される神経伝達物質である。深部小脳核も、 β -gal+細胞を含み、その多くは、NeuN-irで同時標識された(図4F中の黒)。海馬では、細胞の僅かな β -gal+染色が注目されたが、これらの細胞は、NeuN-irを発現するようには見えなかった。

【0071】

赤核中でニューロン表現型を有する β -gal+細胞は、MAP-2免疫応答性線維で網にかけられた(図3F)。光学顕微鏡を用いて、これらの線維が、 β -gal+細胞から遠心性、またはそれに求心性であるかを決定するのは可能でなかった。同様に、小脳のプルキンエ細胞層中の β -gal+細胞は、MAP-2-ir線維中で網にかけられたように見え(図4E)、これらの細胞が小脳のニューロン回路に統合された印象を与えた。骨髄内部の骨髄ストロマ細胞のマーカーである、フィブロネクチンに関する免疫細胞化学染色の欠如は、移植から1ヶ月および3ヶ月後の、部位特異的分化の領域中の天然のBMSC表現型の損失を表示した。

【0072】

β -gal+細胞のトータル数およびニューロンマーカー NeuNを発現する β -gal+細胞の割合は、4匹の動物で、中脳の3つの分離した核(赤核、動眼神経核および黒質それぞれ)において、定位技術を用いて推定した(表1を参照)。BMSC由来ニューロンの評価は、 $30\mu\text{m}$ 低温保存切片中の光学切断器法(Optical Dissector method)を用いて測定した。BMSC由来(β -gal+)細胞は、赤核、黒質および動眼神経核を包含する切片の全セットのために、予め決定されていた均一間隔で、少数の切片中で直接的にカウントされた。カウントされる各切片内で、視野のフィールドは、40X対物レンズを用いて、切片の先端にフォーカスした。続いて、フォーカスを、切片にわたりシフトさせ、上部(切断器の高さ= $9.25\mu\text{m}$)でのフォーカス中のBMSC由来ニューロン・プロファイルの数をカウントした。各領域中のトータ

ル lacZ 細胞カウントおよびトータル二重標識細胞($\text{NeuN}+\text{lacZ}$)を、式： $N=N_v \times V(\text{ref})$
 $\text{ef})=\Sigma Q/(\Sigma P \times v(\text{dis})) \times V(\text{ref})$ [式中、 ΣQ は、参照体積中の全切断器中でカウ
 ントされたニューロンのトータル数であり、 $v(\text{dis})$ は、切断器の高さ($9.25 \mu\text{m}$)
 で掛け算されたテストフレームの領域に等しい切断器の体積であり、該高さは焦
 点平面間の距離である。

【0073】

黒質(s. nigra)および腹側被蓋領域(VTA)を除いて、全ての領域中の $\beta\text{-gal}+$ 細胞の数は、片側右黒質病変および線状への同側移植にもかかわらず、対称的に分布した。右側の黒質およびVTA中の $\beta\text{-gal}+$ 細胞のトータル数は、移植から1ヶ月および3ヶ月後ともに、非病変左側上では、より少なかった。 NeuN-ir を同時発現した $\beta\text{-gal}+$ 細胞のパーセンテージは、動眼神経核中の58.6%から赤核中の89%までの範囲であった。黒質およびVTA中で TH-ir で同時標識された $\beta\text{-gal}+$ 細胞の評価は、移植から3ヶ月後に1匹でのみ為された。黒質中で TH を同時発現した $\beta\text{-gal}+$ 細胞のパーセンテージは、6-OH DA病変の側で12.9%、非病変側で69.7%であった。類似のパターンがVTAで見られ、そこでは、 TH で同時標識された $\beta\text{-gal}+$ 細胞のパーセンテージが、病変側で19.8%、非病変側で50%であった。中脳中の細胞のトータル数の評価は、移植から1ヶ月後の細胞カウントと比較したとき、3ヶ月目で僅かに増加した。1ヶ月目でカウントされた中脳領域の全 $\beta\text{-gal}+$ 細胞の合計は、平均して15,067になり、それは線条にグラフトされた当初の80,000細胞の18%を示す。3ヶ月目で、中脳領域の $\beta\text{-gal}+$ 細胞のトータル数は、平均して18,635になった(移植されたトータルの23%)。 $\beta\text{-gal}+$ 細胞数の僅かな増加は、持続した細胞分割を示すことはありえそうもなく、それは、増殖性細胞核抗原免疫応答性(PCNA-ir)が、BMSCがニューロン形態を仮定したそれらの領域で検出されなかったからである。両側移植を受けた2匹の動物の分析は、グラフトから2ヶ月後に、BMSCの類似の両側性分布および分化のパターンを示した。しかしながら、立体解析評価は、これらの動物で為されなかった。

【0074】

これらの結果は、幾つかのニューロンマーカー、形態学的特徴、および特異的構築層または領域への統合によって示されるように、我々が処理したBMSCが、ニ

ニューロンに分化する多重効力細胞を含むことを示す。我々は、刺激(黒質線条系を病変化)を与え、それにより我々はBMSC分化を誘発することを意図した。しかしながら、黒質病変は、移植の部位で、局所的植え付けに対する陰性の効果を有した。代わりに、 β -gal+BMSCは広範囲に移動し、黒質およびVTAを例外として、脳の全部分で部位依存性に両側対称的分布で分化した。6-OH DA黒質病変の部位では、より少ない β -gal+BMSCがあり、非病変側と比較したとき、それらのうちの少部分がTHを同時発現した。これは、病変の齢(3週間)によって影響されたかもしれない。通常は、神経変性および低酸素-虚血のモデルに細胞を移植する最適な時間がある。脳に移植された他の神経「幹様」細胞は、低酸素-虚血ラットモデルの傷害された半球中の虚血部位に優先的に移動することが示されたが、最適な移動および植え付けは、病変の3-7日後に細胞が移植されたときに達成された。E.Y. Snyderら、ADVANCES IN NEUROLOGY 第72巻: NEURONAL REGENERATION, REORGANIZATION, AND REPAIR.(F.J. Seil編)、Lippincott Raven, フィラデルフィア, 1997。

【0075】

病変は、黒質線条系から遠位の領域では部位依存性分化に影響することはありそうもなかったので、特異的ニューロンポピュレーションに関するBMSCの神経親和性または親和性に関する最もあり得そうな説明は、移植前にレチノイン酸およびBDNFとともにBMSCを前処理したためであった。対照的に、正常ラット線条に移植された非処理ヒトBMSCは、分化するように分布もせず、それらの広範囲な移動にもかかわらず、部位によって分化しないことが示された。S.A. Aziziら、Proc. Nat. Acad. Sci.(U.S.A.)95:3908-3913(1998)。

【0076】

理論に束縛されることを望むものではないが、にもかかわらず我々は、レチノイン酸およびBDNFと一緒にBMSC前処理は、対応する栄養因子、特定のニューロンポピュレーションにより通常産生されるサイトカインまたは細胞接着分子に関する親和性を有する細胞表面タンパク質またはレセプターの発現を誘発することを提案する。これは、特異的脳領域に関してBMSCの親和性のメカニズムを研究する有用なモデルであるように見える。特異的脳領域に関する前処理BMSCのこの親和

性は、神経変性疾患、発作および外傷中の、遺伝子治療から神経再構築までの範囲の細胞治療に関して、ニューロンポピュレーションの標的化を可能にする。

【0077】

β -gal⁺細胞がBMSCから真に誘導されることを確認するために、2つの他の実験が、他のマーカーで標識されたBMSCを用いて行なわれた(下記の実施例7および8)。これは、正常な移植されないラットニューロンの幾つかのポピュレーションが、内因性 β -ガラクトシダーゼ活性を発現するので、必要であった。マウスBMSCの幾つかの他のマーカーの存在により、我々は、 β -gal⁺細胞が実際にマウスに由来し、内因性ラットニューロンではないことを決定した。

【0078】

実施例4. 運動失調治療

「ウップラー(wobbler)」マウス(JAX labs)は、小脳のプルキンエ細胞が3または4週齢で迅速に変性する突然変異を発現する。プルキンエ細胞の損失は、突然変異の優先的効果であるように見え、嗅球の僧帽細胞および数本の視床ニューロン以外の他のニューロンは変性しない。プルキンエ細胞の損失は、一生持続するが動物の健康に影響しない運動失調性「ゆらぎ(wobbly)」歩行の開始に関連する。

【0079】

予め馴化されたBMSC(上記のように)は、これらの動物の脳に6週齢で移植される。トータルで12匹の突然変異動物および12匹の正常動物を、それぞれの実験用に研究する。動物の半分は、LacZマウスからの予め馴化されたBMSCを受け、半分はシャム手術を受ける。目的は、小脳プルキンエ細胞を置き換えることであるが、我々は小脳が移動およびプルキンエ様ニューロンへの部位特異的分化に関する好ましい領域に見えることを実証したので(実施例3)、移植片を線条中に置く。外傷性運動失調を誘発するのを注意深く回避するように、代替的移植部位を、側脳室中に、および小脳に直接的に注入する。

【0080】

移植片が神経学的欠陥の機能的改善を生じるかどうか決定するために、手術前の基線自発歩行を、囲まれた走行路(36"長、3"幅および6"高)の底上で、狭い36

インチ長ストリップの紙上に置かれたインクをしみこませた前肢プリントを記録することによって定量する。さらに、バランスビーム上での能力(2つのプラットフォーム間でつるされたロッドを交叉するのに要求される能力および時間)を測定する。運動および協調のこれらの測定は、突然変異マウスおよび同じ遺伝的バックグラウンドを有するコントロール群の正常マウスの両方で、次の時点：手術の1週間前、および手術後1週間、1ヶ月、2ヶ月および3ヶ月後に行なう。

【0081】

運動および協調に有意な改善がある時点で、動物を犠牲にし、脳を移植されたBMSCの分布および分化の程度について調べる。細胞のBMSC起源を、 β -gal染色により決定する。プルキンエ細胞に関するマーカーは、カルビンジン免疫応答性である。カルビンジンで同時標識される β -gal⁺細胞の割合は、立体解析技術を用いて測定される。

【0082】

実施例5. ヒト骨髄細胞(BMSC)のインビトロでの分化

簡単に要約すると、BMSCを、マウス、仔ウシおよびヒトの全骨髄から分離した。BMSC培養物を、a)上皮成長因子(EGF)、b)レチノイン酸(RA)、c)N5ニューロン培地、およびd)脳由来神経栄養因子(BDNF)プラスRAとともにインキュベートした。

【0083】

BMSCを、残りの骨髄物質(接着ストロマ細胞、脂肪組織およびデブリを有する骨片)から単離し、該物質は、骨髄移植に使用される新らしく調達されたヒト骨髄を濾過するのにルーチンに使用されるナイロンメッシュフィルター上で維持された。濾過物は、骨髄造血エレメントのバルクを含み、該バルクは、続いて、ヒト骨髄交換のために処理される。我々は、通常は棄てられるフィルターを使用する。フィルターは、PBSで5回戻し洗浄した。PBS溶液は、より重い骨片を沈着するように遠心分離された。上清を、培養培地に再懸濁し、組織培養フラスコにプレートした(実施例1でのように)。BMSCは、プラスチック製培養フラスコへのそれらの接着により分離されたが、より少数の造血幹細胞が培地中に懸濁されて残り、培養培地が新鮮な培地と交換されるときに除去された。プレーティング用の

ヒト骨髓分画は、ダルベッコ最少必須培地 (DMEM, GIBCO/BRL) および10%FBSを用いて1:1に希釈され、密度勾配 (Ficoll-Paque Plus, 1.077g/ml, Pharmacia) で30分間1,000Xgで遠心分離した。上清および界面を混合し、10%ウシ胎児血清 (FSC) を有するMEMで約20mlに希釈し、ポリエチレンイミンでコートされたプラスチック製フラスコにプレートした。

【0084】

マウス骨髓を、10ml PBSおよび5%BSAに入れた。細胞を、この培地中で洗浄し、遠心分離した (2000rpmで5分間)。細胞を、2mMグルタミン、0.001%β-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、および10%ウマ血清を補足したDMEMからなる増殖培地に再懸濁した。細胞は、フラスコ中で2日間インキュベートし、培地を交換することにより非接着細胞を除去した。培地がコンフルエンスに達した後、細胞を、トリプシン (0.25%) および1mM EDTAとともに37℃で3-4分間インキュベーションしてリフトした。その後、それらを、後の使用のために凍結し、上皮成長因子 (EGF)、10ng/mlまたは血小板由来成長因子 (PDGF) 5ng/mlの添加により1:2または1:3希釈後に、再プレートした。この手順は、3-5継代繰返し得る。

【0085】

ヒト全骨髓細胞を、培養フラスコ底に2日間接着させ、フラスコから除去後、マイトジェン、上皮成長因子 (EGF) を含む培地中で再プレートした。これは、分化の有意な誘発なしに、細胞の増殖を生じた。続いて、細胞を、フラスコ底から除去し、ウシ胎児血清 (FSC) 10%、レチノイン酸 (RA) および幾つかの成長因子 (BDNF, GDNFまたはNGF) の1つを補足した神経増殖培地 (N5) の存在下に、35mm培養皿中で再プレート (または後の使用のために凍結) した。通常の骨髓ストロマ細胞は、フィブロネクチン豊富であった (図5A中の白)。7-14日後、少ない割合 (<2%) のヒトBMSCは、区別可能なニューロン様表現型およびマーカーを発生した。培養物の免疫細胞化学分析は、ネスチン-ir細胞 (図5B)、NeuN-ir細胞 (図5C) およびGFAP-ir細胞 (図5D) の存在を実証した。RAおよびBDNFとともにインキュベートされたBMSCは、ニューロンマーカーNeuNの発現を生じる一方、発現されたフィブロネクチンの量は、EGF単独で馴化された培地に比較して減少した。

【0086】

7日後、ニューロンマーカー(ネスチン、ニューロン特異的核タンパク質またはNeuNおよびGFAP)および骨髄ストロマ細胞マーカー(フィブロネクチン)の発現を、ウェスタンブロット分析および免疫細胞化学で分析した(図6)。ウェスタンブロット分析のために、培養物を、冷PBS中で3回洗浄し、氷冷PBS中でそぎ落とし、20mM Tris/HCl(pH=8.0)、0.2mM EDTA、3%Nonidet P-40、2mM オルトバナデート、50mM NaF、10mM ピロリン酸ナトリウム、100mM NaCl、およびml当り各10 μ gアプロチニンおよびロイペプチンを含む氷冷溶解緩衝液中で溶解した。氷上で10分間インキュベーション後、サンプルを14,000xgで15分間遠心分離し、上清を集めた。アリコートをし、トータル蛋白質評価(Bio-Radアッセイ)のために除去した。各サンプルのトータル蛋白質の30 μ gに対応するアリコートを、還元条件下でSDA/PAGEにより分離し、電気泳動によりニトロセルロースフィルターに移した。抗体の非特異的結合を、3%BSAとともに2時間インキュベートすることによりブロックした。免疫ブロッティングを、ウサギ抗trk Aレセプター(または興味ある成長因子レセプターに関する好適な抗体)、続いて、ペルオキシダーゼ複合体化二次抗イムノグロブリン抗体を用いて行ない、ブロットを増強化学蛍光法(ECL, Amersham)により展開させた。細胞培養ライゼートのウェスタンブロット(図6)は、BDNF+RA+N5(カラム4)が、ヒトBMSCにおいてネスチン-irおよびNeuN-irの最も高い発現を生じるという予備的証拠を提供した。

【0087】

さらに、上記のようにフラスコ底から除去された細胞(BMSC)、または磁気細胞ソーティングによって分離された細胞を、ニューロン増殖培地(N5)の存在下に35mm培養皿中で再プレートし、該培地は、5%ウマ血清、1%FBS、トランスフェリン(100 μ g/ml)、プトレシン(60 μ M)、インシュリン(25 μ g/ml)、プロゲステロン(0.02 μ M)、セレニウム(0.03 μ M)、9-シスレチノイン酸または全トランスレチノイン酸(RA)(0.5 μ M)、および幾つかのニューロン成長因子の任意の1つを濃度1-10ng/ml(脳由来成長因子-BDNF、グリア由来神経栄養因子-GDNF、または神経成長因子-NGF)を補足されていた。7-14日後、BMSCの幾つかは、形態を変化させ、ニューロン、グリアおよび線維芽細胞の表現型を発生した。

【0088】

実施例6. ヒトBMSCをラット胎児線条培養物と同時培養する効果

RAおよびBDNFで馴化されたマウスBMSCは、E15胎児ラットから調製される一次ニューロン中脳細胞と同時培養した。ヒトBMSCを、上記方法を用いて樹立した。細胞を、 $10\mu\text{M}$ 濃度の蛍光緑"セルトラッカー (cell tracker)"(5-クロロメチルフルオレセインジアセテート、Molecular Probes, Inc.)で標識し、3日前に調製されたラット胎児線条細胞の細胞床上にプレートした。N5培地中で、培養物に、RA($0.5\mu\text{M}$)+BDNF(10ng/ml)を供給した。10日間培養した後、NeuN、GFAP、ネスチンおよびフィブロネクチンに対する一次抗体、続いて、テキサスレッドフルオレセイン標識された二次抗体を用いて、細胞を免疫細胞蛍光のために処理した。これは、ニューロン、グリアまたは神経外胚葉に関する特異的マーカーを示す細胞が骨髄起源も有するかどうか決定するための、細胞の二重標識を可能にした。図7A-7Fを参照。図7Aは、ニューロンマーカー (NeuN)に関する細胞の免疫応答性を示す。図7Bは、グリア細胞マーカー (GFAP)を示す。図7Cおよび7Dは、白色標識された細胞(セルトラッカー標識されたBMSC)とともに、対応する領域を示す。図7Eおよび7Fは、二重標識された細胞を示す。興味深いことに、NeuN-ir細胞の2つはBMSC起源のものであり、GFAP-ir細胞の1つはBMSC起源のものである。これらのデータは、ヒト並びにマウス起源のBMSCが、神経表現型を有する細胞に分化し得たという更なる証拠を提供する。

【0089】

一次ラット中脳培養物と同時培養されたLacZ標識BMSCは、NeuN-irおよび $\beta\text{-gal}$ で同時標識されたニューロン様細胞に分化した。

【0090】

実施例7. インビボ

マウスlacZ BMSCを、予め6-OH-ドパミンで病変化されたラットの脱神経化された線条体および非病変化ラットに移植した。1および3ヶ月後、ラットを犠牲にし、組織化学および免疫細胞化学のために脳を処理した。BMSC由来細胞を、 $\beta\text{-gal}$ +染色により又はマウス主要組織適合性抗原タイプIに対する抗マウス抗体により、可視化した。BMSC由来細胞中のニューロンマーカーの発現は、ニューロン

特異的核抗原(NeuN-ir)、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、微小管関連蛋白質(MAP2)、神経フィラメント(NF)、およびカルビンジン(CB)に対する抗体に対するそれらの免疫応答性によって測定される。

【0091】

線条に移植されたBMSC由来細胞は、それらが移植された線条への局在化を維持しなかったが、抗マウス抗体で同定されるときは、中脳、視床および稀に小脳で見い出された。これらのマウスBMSCの幾つかは、NeuN-irまたはTH-irを同時発現した。移植された及びコントロール(非移植)ラットの両方とも、類似および異なる分布で β -gal⁺細胞を示した。 β -gal⁺細胞は、嗅球、視索上核および室傍視床下部、赤核、第3神経核、黒質で見い出され、非移植ラットにおけるプルキンエ細胞と同一のパターンで小脳に分布していた。

【0092】

RAおよびBDNFで馴化されたBMSCは、ニューロンマーカーを発現し、ストロマおよび線維芽細胞マーカーの発現を減少した。馴化lacZ BMSCが一次中脳ニューロンと同時に培養されたとき、多くのBMSC由来細胞は、NeuN-irおよび β -gal⁺を同時発現した。脱神経化線条に移植されたとき、馴化BMSCは、幾つかのニューロンマーカーを発現し、移植された部位から、視床の両側に、およびより低い程度で海馬に、および非病変黒質に移動した。非移植ラット中の β -gal⁺活性に関する陽性染色は、 β -gal⁺ BMSCに関して容易に誤認され得た人工物を生じた。しかしながら、BMSCに関する第2マーカーは、これらの細胞が移動し、ニューロン様細胞に分化することを確認した。

【0093】

実施例8. BMSCの第3マーカーを用い、BMSCが神経細胞(ニューロンまたはグリア)に分化することを示すインビボ・データ

先の実施例は、マウスからの β -gal⁺ BMSC、およびマウスに特異的な抗体を用いた。この実験では、上記のように脱神経化ラット線条に移植する前に、マウスBMSCを、赤蛍光PKH26(Sigma, Inc.)またはセルトラッカーオレンジ(Molecular Probes, Inc.)で予め標識した。移植から2週間後、蛍光BMSCは、移植部位から移動した(幾つかは、逆側部側上の大脳皮質へ)。僅か2週間後、移植された細胞の

小部分は、NeuN-irおよびGFAP-irのような神経マーカーを発現することを開始した(図8および9)。赤PKH26で標識されたマウスBMSCも、ニューロンマーカーNeuN(図8中の白)を発現した。さらに、二重標識された細胞の形態は、ニューロンのものである。画像は、Zeiss LSM510共焦点スキャニング顕微鏡を用いて行なった。図9では、赤蛍光トレーサー(灰色)を用いてそれをBMSC由来細胞として同定する二重標識されたグリア細胞があり、緑蛍光(白)はGFAP-irによる。形態は、グリア細胞のものであることに注目のこと。

【0094】

産業的用途

上記の実験における脳組織切片の検査は、線条体中の移植部位から遠い複数の脳領域中にBMSC-由来gal+細胞を再生することを明示した。処理されたBMSCの移動は、次の脳領域：嗅球の僧帽細胞ゾーン、視床下部の室傍および視索上核、海馬、小帯、動眼神経核、赤核、黒質、外転、顔面および舌下脳神経核、延髄の下オリブ、脊髄の前角、および小脳プルキンエ細胞層を含むがそれらに限定されない。BMSC β -gal+細胞は、脈絡叢の上皮様立方体様細胞；視交叉および皮質下白質中の小さい稀突起神経膠細胞様細胞；赤核、黒質、および脳幹運動核中の大きいニューロン様細胞を含む複数の表現型を仮定した。神経移植のこの新規な方法は、科学的に実行可能であり、神経変性疾患および発作の治療、並びに脳および脊髄への外傷性損傷の修復のための、臨床的に有望なアプローチである。

【0095】

大学および薬学的発見の実験室では、BMSCに関する多くの使用がある。ラットモデルで小脳に移動し、プルキンエ細胞の特性を仮定するヒトBMSCは、ヒト小脳細胞に対する薬剤の効果(治療および毒性の両方)をテストするのに使用され得る。同様に、それらの細胞の特性を仮定する脳の他の領域中に移植されたヒトBMSCも、様々な疾患における薬剤毒性および治療の有効性をテストするために、使用され得る。移植前、細胞は、様々な脳および神経系疾患に関与する遺伝子を担持するように遺伝子的に操作され得る。

【0096】

BMSCの移動的および再生的性質の1つの可能性のある使用は、パーキンソン病

の治療である。予め処理されたBMSCは、その状態で移植されるために使用された胎児ニューロンに置き換わり得る。レチノイン酸およびBCNFで処理されたBMSCは、黒質に移動するのが示され、そこでは、ドパミン作動性ニューロン欠損はPDを生じる。BMSCの黒質へのデリバリーは、黒質ニューロンを再生させ、その領域へのドパミンの流動を復帰させ得た。

【0097】

小脳プルキンエ細胞層の再生は、患者の協調運動を改善するのに寄与し得る。小脳の回復は、小脳腫瘍、代表的には、子供に起こる髄芽腫に有用であるだろう。成人では、類似の症候群が、慢性アルコール症で見られ得、それは虫部の変性を生じる。患者は、不安定なよろめき運動失調歩行を有する；彼または彼女は、広い基線上を歩いて端から端へとゆらぐ。Barr, M.L.およびKiernan, J.A. THE HUMAN NERVOUS SYSTEM, AN ANATOMICAL VIEWPOINT、第6版、J.B. Lippincott Company、フィラデルフィア(1993)。

【0098】

BMSCの移動および再生のための他の使用は、嗅球の僧帽細胞ゾーン中にある。嗅球からのインパルスは、匂いおよび香りの主観的知覚のために、嗅覚領域に運ばれる。Barr, M.J.およびKiernan(同上)。この脳領域へのBMSCの移動および再生は、毒性化学物質、老化および外傷による味覚損失を治療し得る。

【0099】

BMSC投与は顔面および舌下脳神経核の再生および、発作または他の外傷後の顔面筋肉の運動の回復に使用され得る。

【0100】

BMSC投与は、脊髄の前角の再生および外傷部から脊髄まで損なわれた運動技能の回復を援助し得る。

【0101】

BMSC投与は、傷害された海馬領域の再生に寄与し得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、棒グラフである。培養皿に接着したBMSCは、EGF(10ng/ml)、RA(0.5 μ

M)またはRAプラスBDNF(10ng/ml)で7日間処理した。それぞれの棒は、4培養皿中で皿当たり20視野で測定された、視野当たり(20X対物レンズ)フィブロネクチン免疫応答性細胞の平均数(±SEM)を示す。* $p < 0.05$ 、両側、 t -検定。

【図2】

図2A~2Fは、シス-9レチノイン酸($0.5 \mu\text{M}$)およびBDNF(10ng/ml)を補足されたN5培地中で2週間、マウス胎児中脳細胞と同時培養されたlacZマウスからのBMSCを示す。

【図3】

図3A~3Fは、BMSCのラット中脳への移動および統合を示す。図3A(スケール棒= $500 \mu\text{m}$)は、線条への片側移植にもかかわらず、対称的な分布を示す。図3Bは、室傍核の領域である(スケール棒= $100 \mu\text{m}$)。β-gal+細胞は、いずれもTH-irで標識されていない。図3A(スケール棒= $500 \mu\text{m}$)、3B(スケール棒= $100 \mu\text{m}$)および3C(スケール棒= $50 \mu\text{m}$)は、β-galおよびTH-irを有する細胞を示す。図3D(スケール棒= $50 \mu\text{m}$)および3E(スケール棒= $25 \mu\text{m}$)は、β-galおよびNeuN-irに関して二重標識された赤核の切片標本を示す。図3F(スケール棒= $25 \mu\text{m}$)は、MAP2-irに関して二重標識もされた赤核からのβ-gal+細胞を示す。

【図4】

図4A~4Fは、ラット小脳小葉およびプルキンエ細胞の分布中のβ-gal+細胞の層状分布を示す。β-gal+細胞は、図4A、4B、および4C中でカルビンジン免疫応答性で同時標識された(図4Aではスケール棒= $100 \mu\text{m}$ 、図4Bでは $50 \mu\text{m}$ 、および図4C中では $25 \mu\text{m}$)。図4Dは、GAD-irで同時標識されたβ-gal+プルキンエ細胞を示す(スケール棒= $50 \mu\text{m}$)。図4Eは、β-gal+プルキンエ細胞を包膜する密なMAP2-ir線維を示す(スケール棒= $25 \mu\text{m}$)。図4Fは、深部小脳核中でNeuN-irで同時標識されたβ-gal+細胞を示す(スケール棒= $25 \mu\text{m}$)。

【図5】

図5A~5Dは、フィブロネクチンに関するマーカー(図5A)および神経細胞マーカーを有する分化したBMSCを示す(図5B、5Cおよび5D)。

【図6】

図6は、4つの異なる処理で馴化し、GFAP-ir、ネスチンおよびNeuNで標識さ

れたBMSCのライゼートのウェスタンブロットである。BDNF+RA+N5は、神経細胞マーカーの最も強力な発現を誘発する一方、グリア細胞マーカーは、N5単独の後に、最も強力に発現された。

【図7】

図7A～7Fは、BDNF+RAを有するN5配合物中の、胎児ラット線条体細胞で同時培養されたヒトBMSCを示す。これらの図は、ヒトBMSC(図7Cおよび7D中の白、ならびに図7Eおよび7F中の灰色)が、神経マーカーNeuN(図7Aおよび7E)およびGFAP(図7Bおよび7F)を発現するように誘発され得ることを示す。

【図8】

図8は、ラット脳を示し、そこでは、灰色PKH26で標識されたマウスBMSCも、ニューロンマーカーNeuN-ir(白)を発現する。さらに、二重標識された細胞の形態は、ニューロンのものである。

【図9】

図9は、二重標識されたグリア細胞を有するラット脳を示す。灰色トレーサーは、それがBMSCに由来するものと同定し、細胞の白い陰はGFAP-irによる。形態は、グリア細胞のものであることに注目のこと。

【図1】

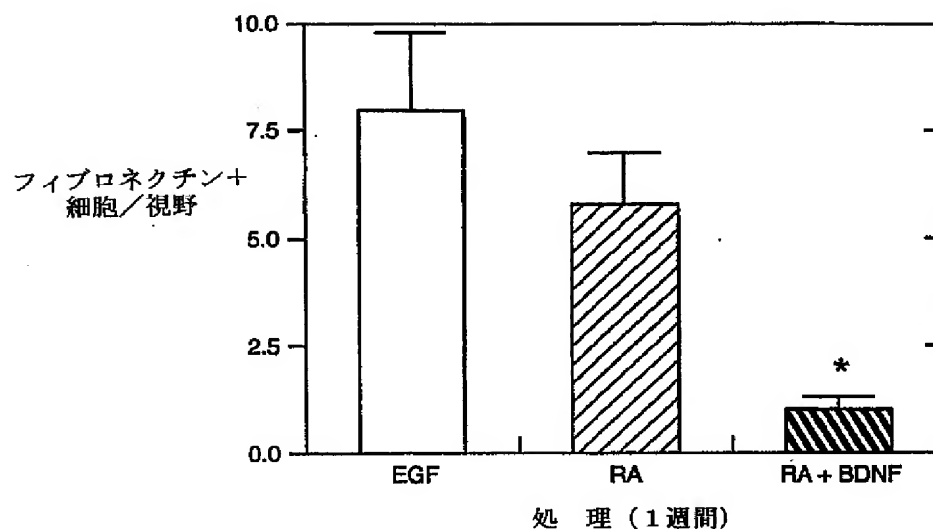
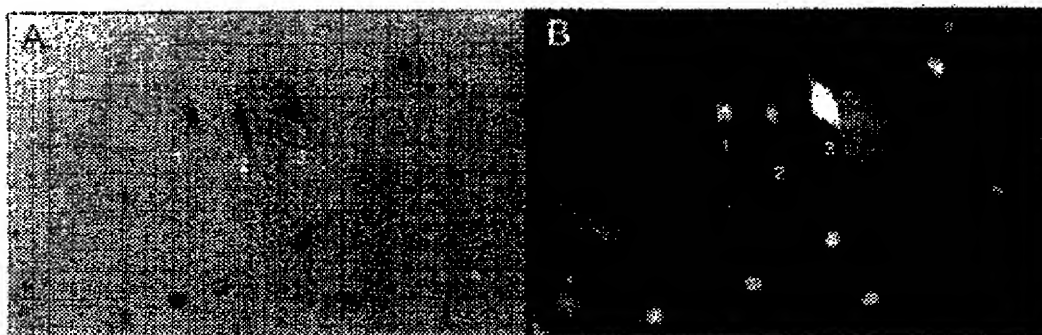
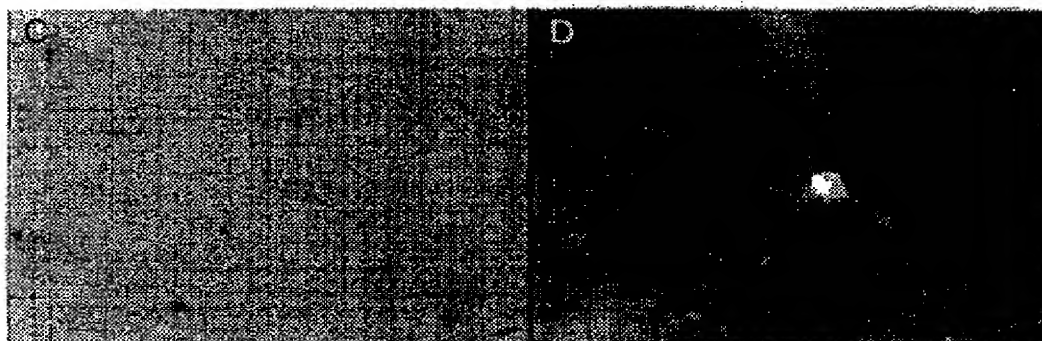
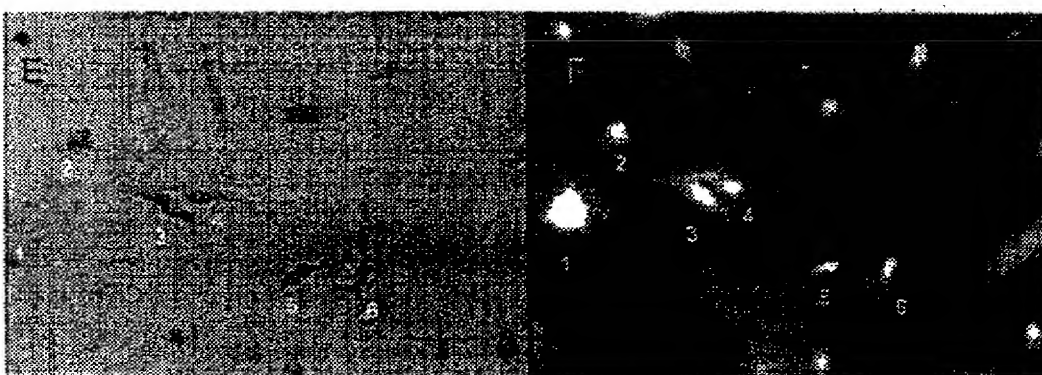
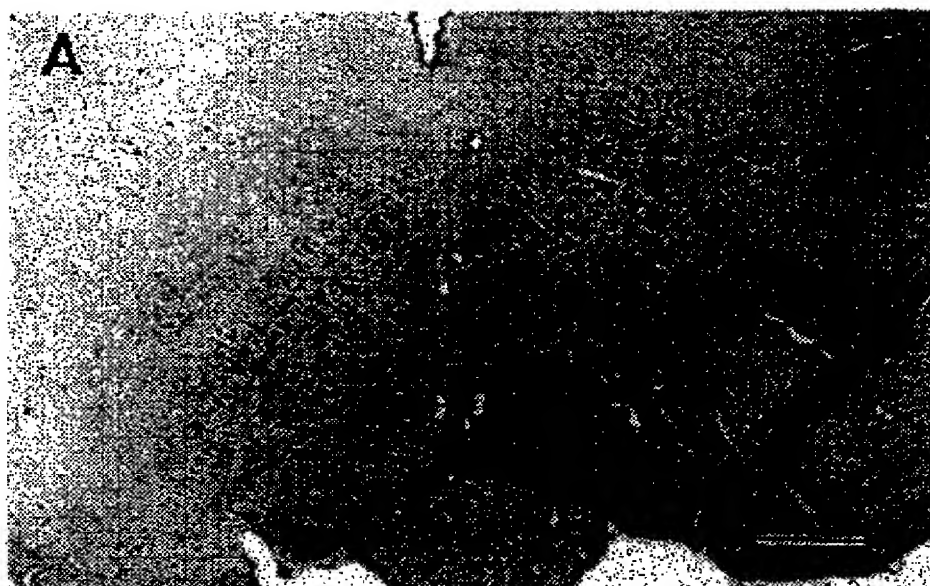
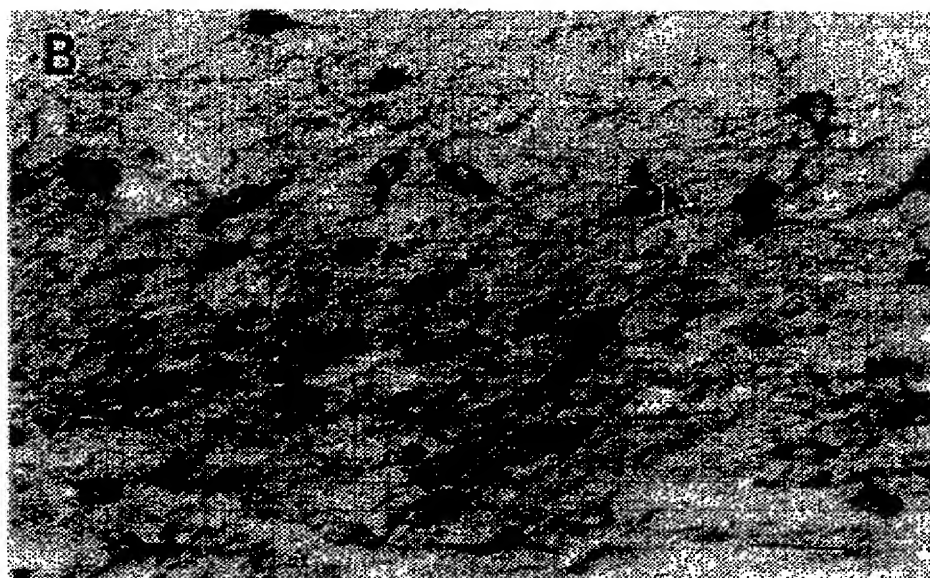


FIG. 1

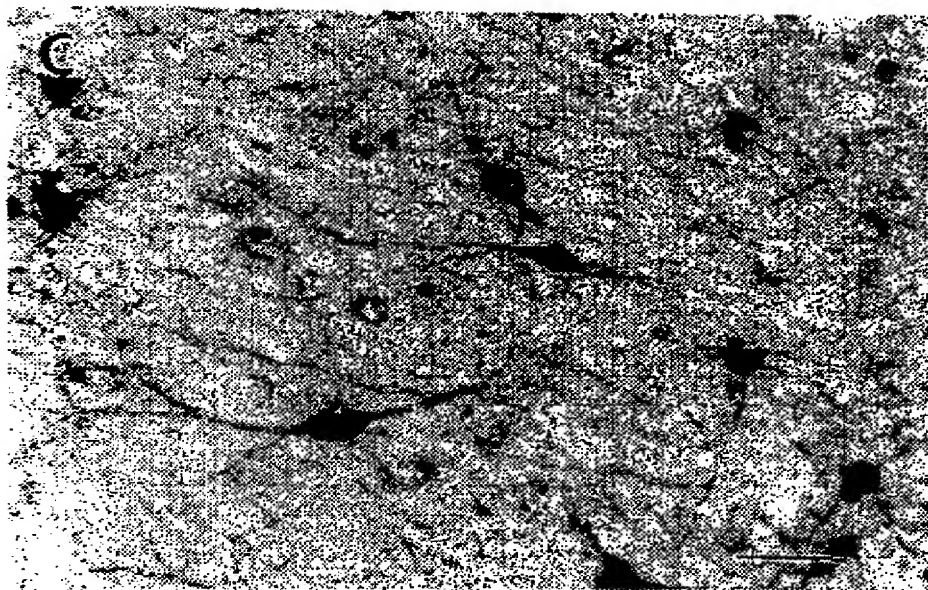
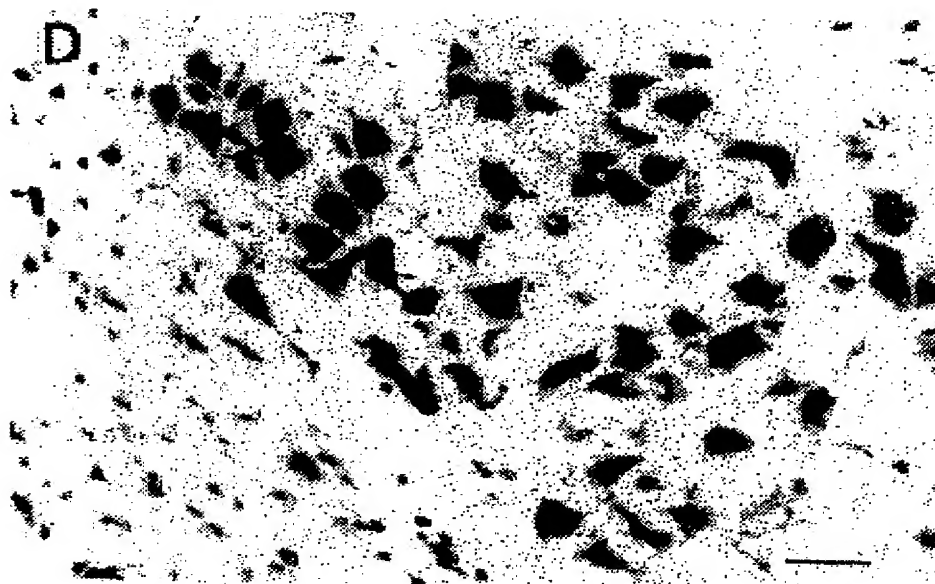
【図2】

**FIG._2A****FIG._2B****FIG._2C****FIG._2D****FIG._2E****FIG._2F**

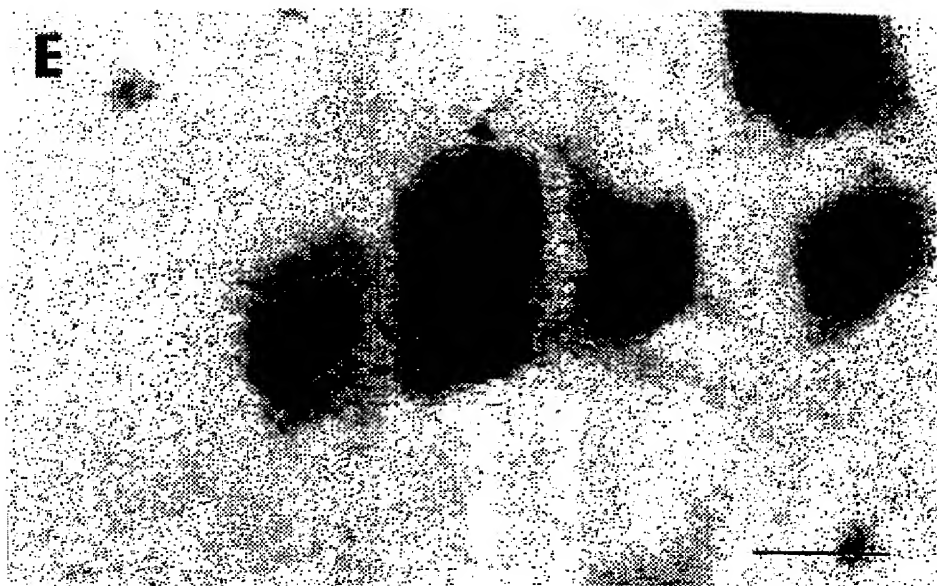
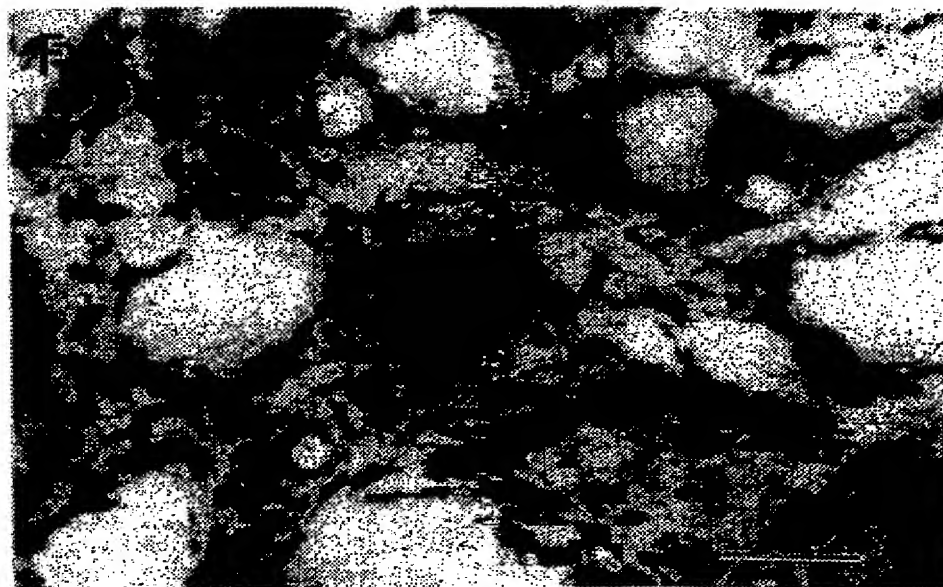
【図3A・B】

**FIG._3A****FIG._3B**

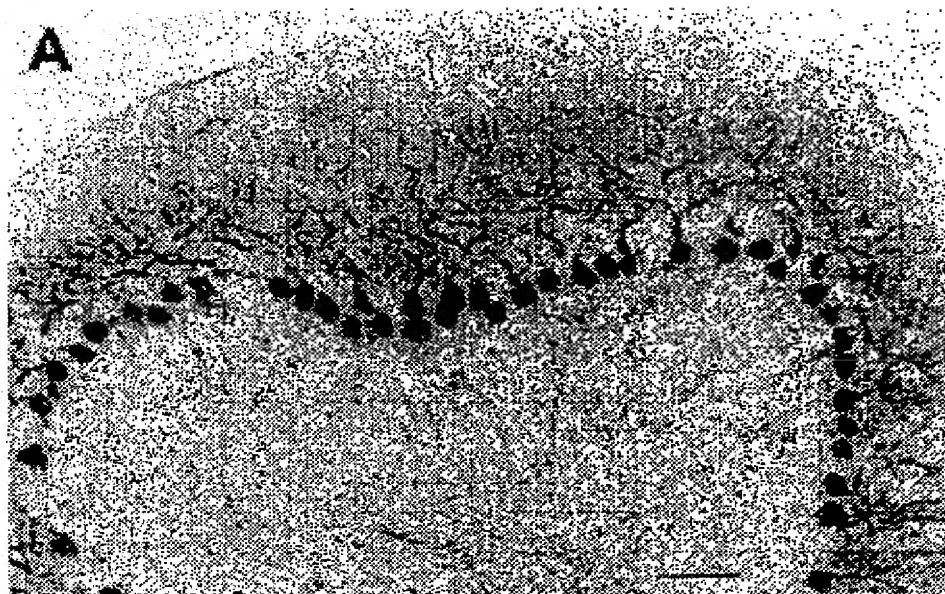
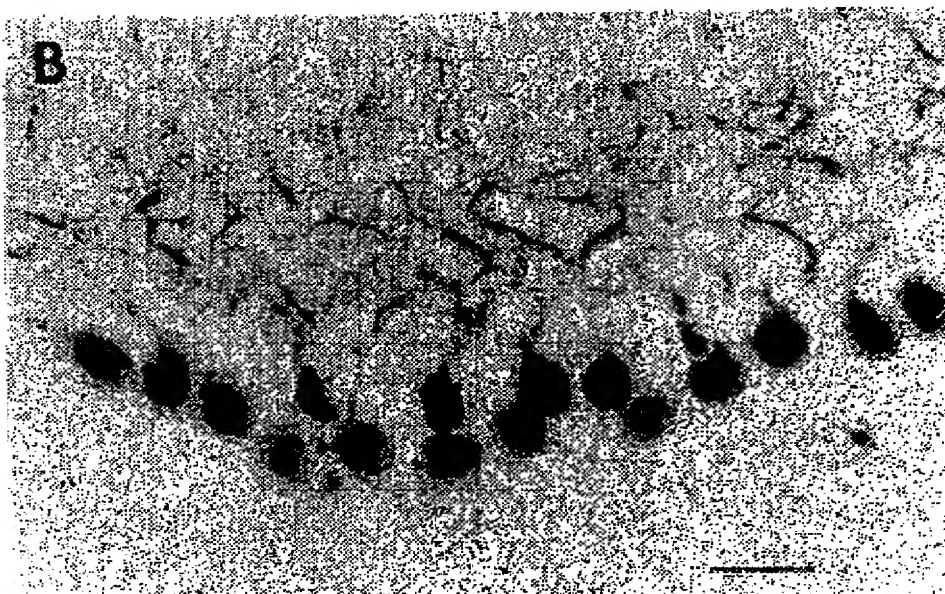
【図3C・D】

**FIG._3C****FIG._3D**

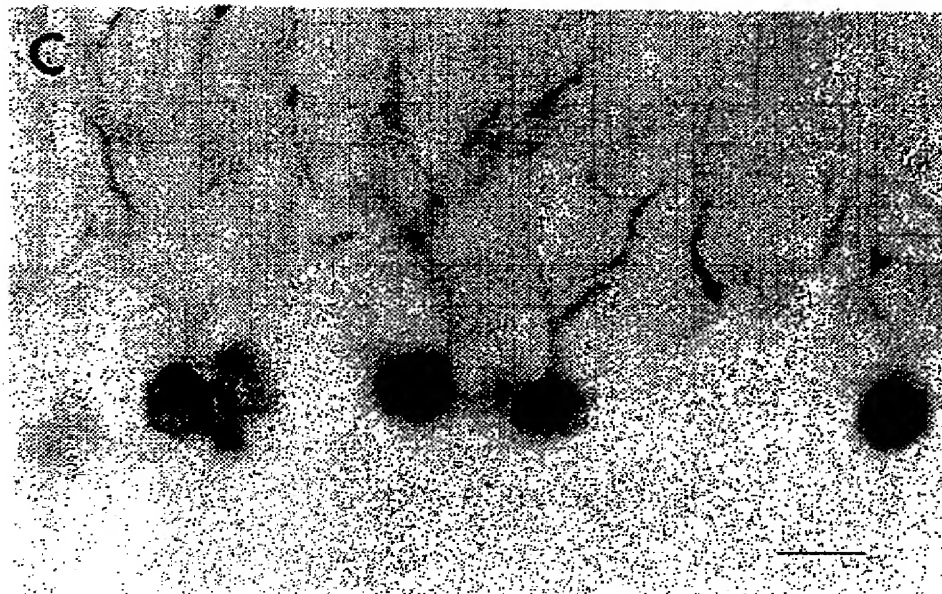
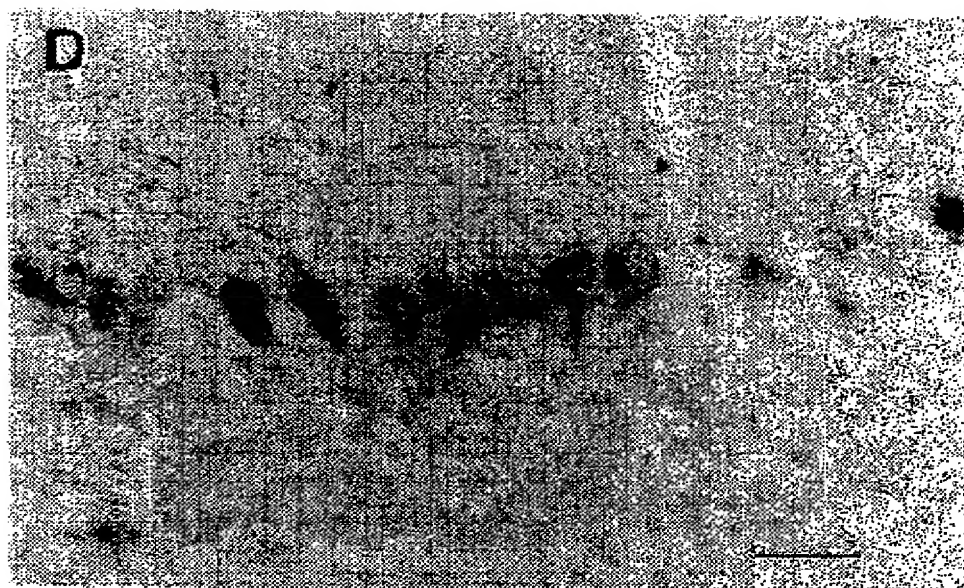
【図3E・F】

**FIG._3E****FIG._3F**

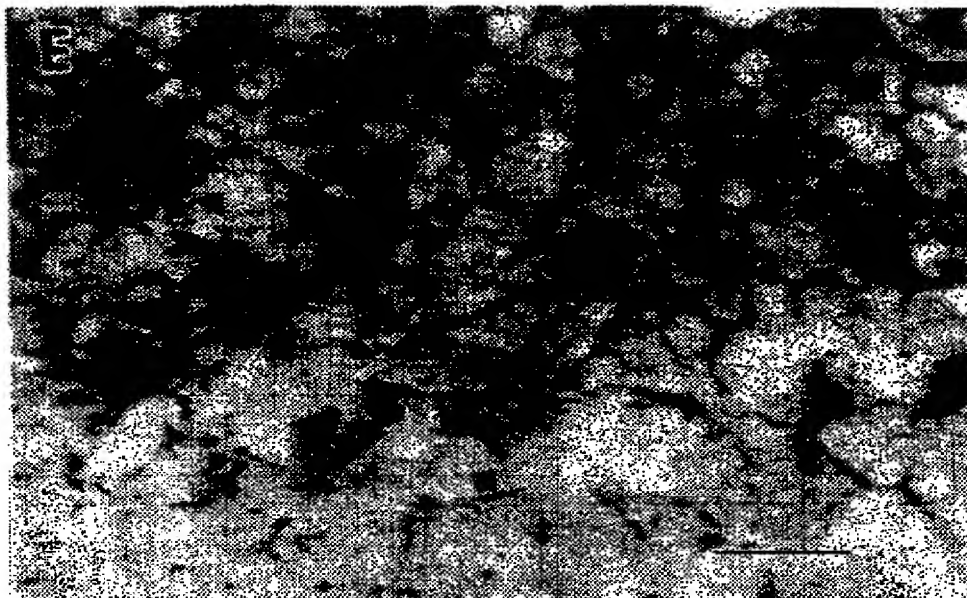
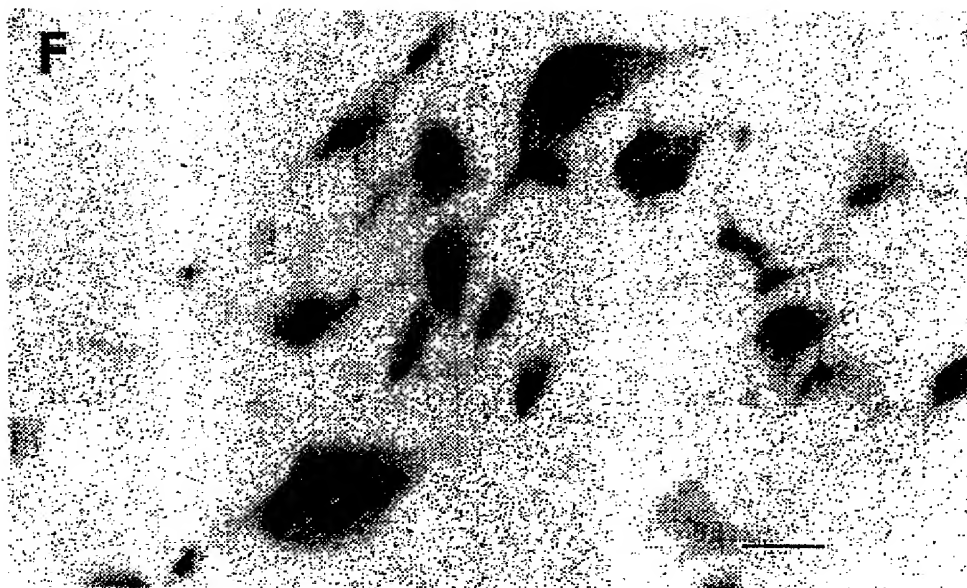
【図4A・B】

**FIG._4A****FIG._4B**

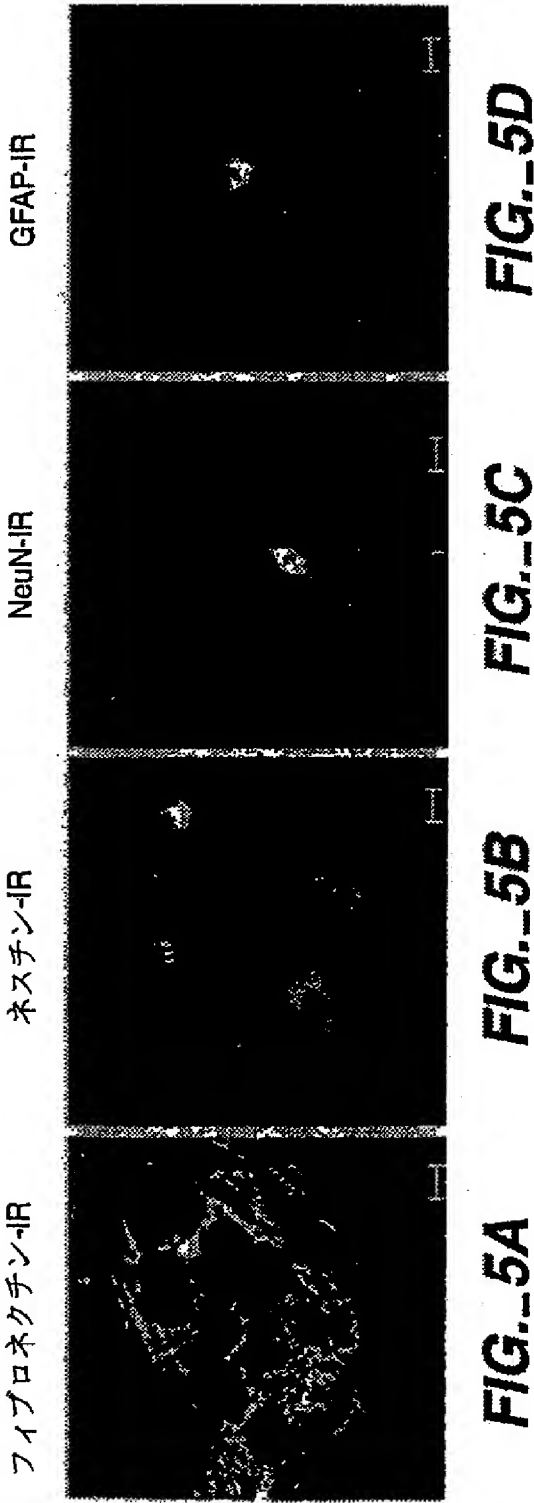
【図4C・D】

**FIG._4C****FIG._4D**

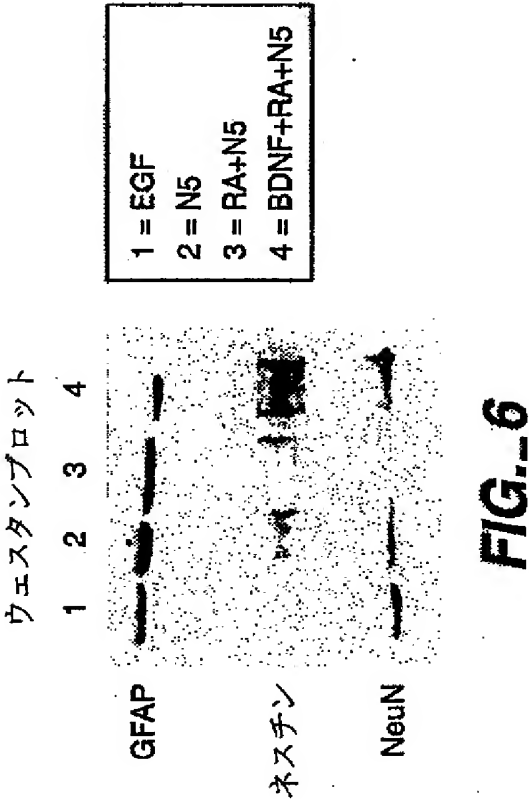
【図4E・F】

**FIG._4E****FIG._4F**

【図5】

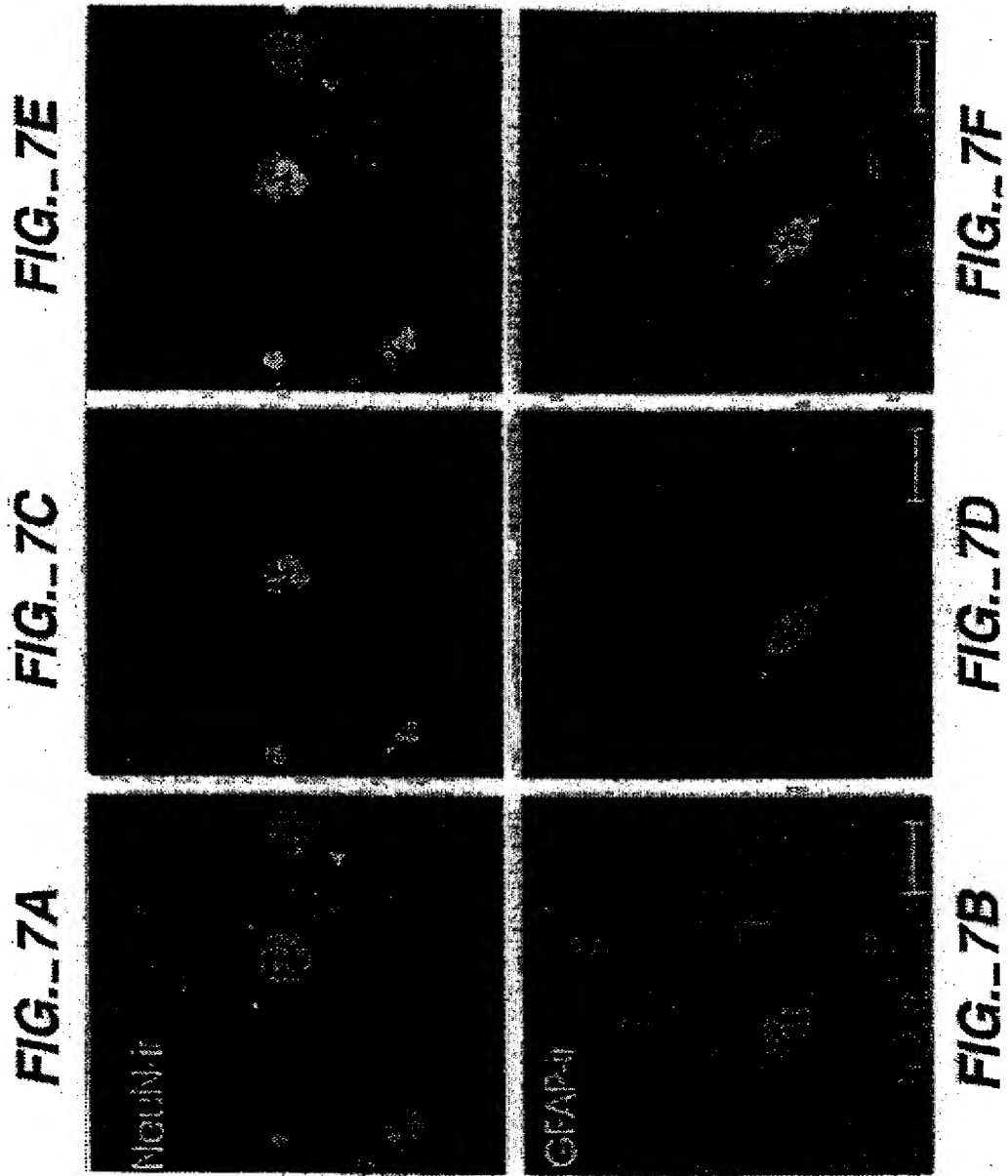


【図 6】

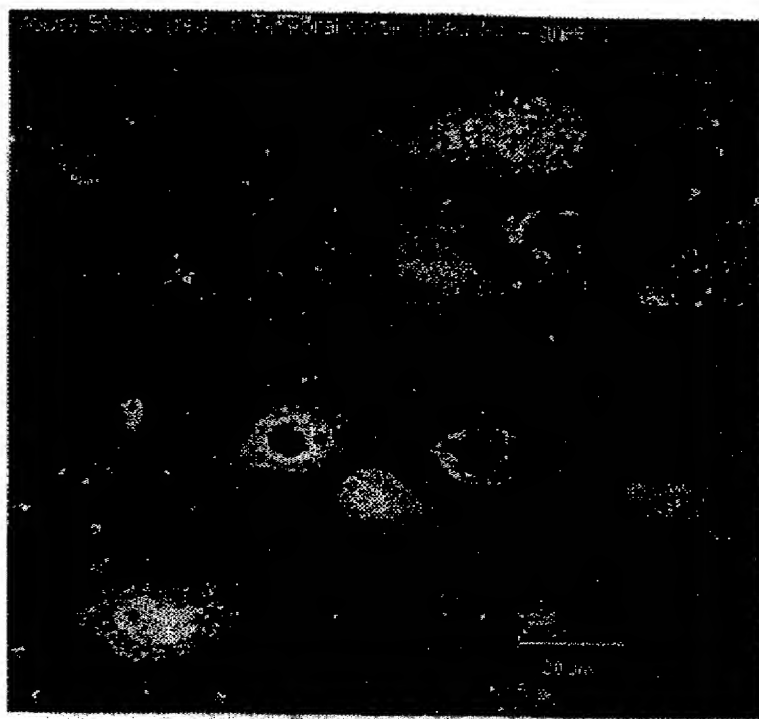


【図7】

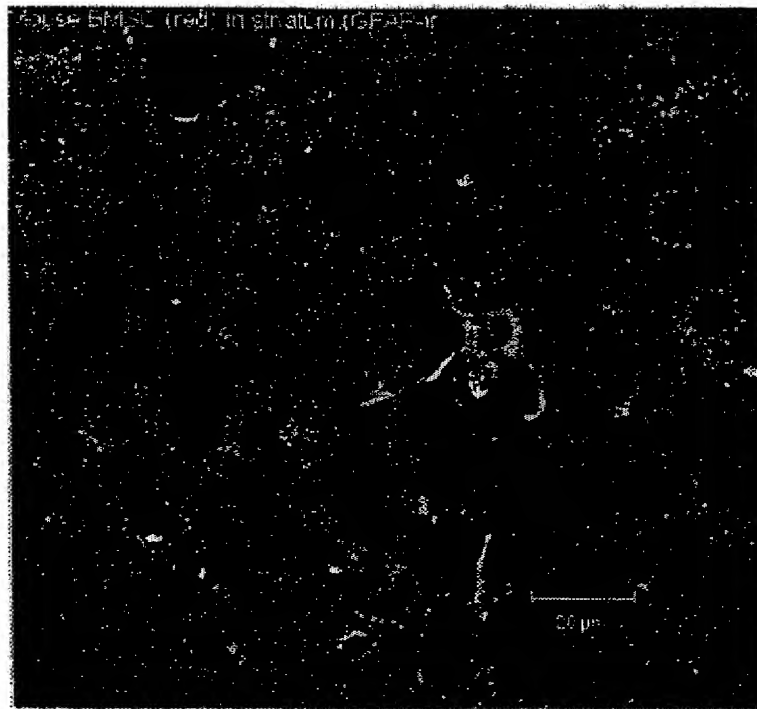
ヒトBSCおよび胎児ラット線条細胞の同時培養



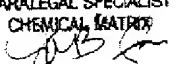
【図8】

**FIG._8**

【図9】

**FIG. 9**

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US99/10012
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) :A61K 35/28; A01N 35/28; C12N 5/06, 15/83, 15/86 US CL :424/93.7; 435/ 1.1, 325, 405 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/93.7; 435/ 1.1, 325, 405; 530/351 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Author search Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, BIOSCIENCE, MEDLINE, EMBASE, USPATFULL, JICST-EPLUS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	WO 95/00632 A1 (AGMEN INC. 05 January 1995, Abstract, page 3 lines 25-36, page 4 lines 1-4, page 8 (i), lines 21-26, page 9 line 41, page 10 line 3, claims 1-20, culture media containing relevant factors PDGF and EGF.	1-20 ----- 1-6, 8-13, 15-17, 20.
X -- Y	AZIZI S.A. et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. Pro. Natl. Acad. Sci. USA March 1998, Vol. 95, page 3908-1913, Abstract, Materials and Methods, Neurotransplantation, 3910, Migration, 3911, Discussion.	1-6, 8-13, 15-20 ----- 1-6, 8-13 15-20
X -- Y	RICKARD D.J. et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J. Bone Mineral Res. 1996, Vol. 11, No. 3, see Abstract, Materials and Methods, page 313, method of removing hematopoietic and incubation with PDGF.	1-6, 8-13, 15-17, 20 ----- 1-6, 8-13, 15-17, 20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 JULY 1999		Date of mailing of the international search report 10 SEP 1999
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer SHARON L. TURNER Telephone No. (703) 308-0196 JOYCE BRIDGERS PARALEGAL SPECIALIST CHEMICAL PATENT 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US99/10012

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	SATOMURA K. et al. Receptor tyrosine kinase expression in human bone marrow stromal cells. J. Cell Physiol. 1994, Vol. 177, pages 426-387, see Abstract, Fig. 2-7.	1-20 --- 1-20
A	ABBOUD et al. Peptide growth factors stimulate macrophage colony-stimulating factor in murine stromal cells. Blood. 01 July 1991, Vol. 78, No. 1, pages 103-109. PDGF stimulates MCSF in stromal cells, page 107, Figure 4A.	1-20
Y	NAKAJIMA H et al. Retinoids (all-trans and 9-cis retinoic acid) stimulate production of macrophage colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human bone marrow stromal cells. Blood. 15 December 1994 Vol. 84, No. 12, pages 4107-4115, entire document.	6, 8, 13, 15
X -- Y	TANAKA et al. Effect of platelet-derived growth factor on Dna synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. J. Cell Physiol. 1995, Vol. 164, pages 367-75, incubation of stromal cells with PDGF.	1-20 --- 1-20

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10		C 1 2 N 5/00	B

(31)優先権主張番号 60/129,684

(32)優先日 平成11年4月16日(1999. 4. 16)

(33)優先権主張国 米国 (US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 サンバーク ボール アール,
アメリカ合衆国 34610 フロリダ スプリング ヒル パイロット カントリー
ドライブ 11751

(72)発明者 ジャンセン ウィリアム
アメリカ合衆国 33624 フロリダ タンパ
バ スクワーレル トゥリー プレイス
15712

(72)発明者 フリーマン トーマス
アメリカ合衆国 33613 フロリダ タン
パ シャディー ショアーズ ドライブ
14002

F ターム (参考) 4B024 AA01 DA02 DA03 GA18
4B065 AA91X AA93X BB23 BB34
CA24 CA44
4C085 HH20 KB82 KB99 LL13
4C087 AA01 BB44 CA04 MA02 NA14
ZA02 ZA15 ZA16 ZA20 ZA36
ZB22 ZC39